



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA AVICULTURA: EFEITOS DO
USO PROFILÁTICO DE CEFTIOFUR E DO TRATAMENTO QUÍMICO
DA CAMA NA DISSEMINAÇÃO DE BETALACTAMASES**

MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA

**AREIA – PARAÍBA
SETEMBRO DE 2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA AVICULTURA: EFEITOS DO
USO PROFILÁTICO DE CEFTIOFUR E DO TRATAMENTO QUÍMICO
DA CAMA NA DISSEMINAÇÃO DE BETALACTAMASES**

MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA
Médico Veterinário

**AREIA – PARAÍBA
SETEMBRO DE 2018**

MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA AVICULTURA: EFEITOS DO USO
PROFILÁTICO DE CEFTIOFUR E DO TRATAMENTO QUÍMICO DA CAMA
NA DISSEMINAÇÃO DE BETALACTAMASES**

Tese apresentada ao Programa de
Doutorado Integrado em Zootecnia
da Universidade Federal da
Paraíba, Universidade Federal
Rural de Pernambuco e
Universidade Federal do Ceará
como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em
Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira – Orientador principal

Profa. Dr. Oliveira Caetano Freitas – Segundo orientador

Prof. Dr. Wondwossen Abebe Gebreyes – Terceiro orientador

AREIA – PARAÍBA

SETEMBRO DE 2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S243r Saraiva, Mauro de Mesquita Sousa.

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA AVICULTURA: EFEITOS
DO
USO PROFILÁTICO DE CEFTIOFUR E DO TRATAMENTO QUÍMICO DA
CAMA NA DISSEMINAÇÃO DE BETALACTAMASES / Mauro de
Mesquita Sousa Saraiva. - Areia, 2018.
113 f.

Orientação: Celso José Bruno Oliveira.
Coorientação: Oliveira Caetano Freitas, Wondwossen
Abebe Gebreyes.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. antimicrobianos na avicultura. 2.
cefalosporinas. 3.
plasmídeos. 4. resistência. I. Oliveira, Celso José
Bruno. II. Freitas, Oliveira Caetano. III. Gebreyes,
Wondwossen Abebe. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “Resistência antimicrobiana na avicultura: Efeitos de profilaxia com ceftiofur e do tratamento químico da cama na disseminação de betalactamases”

AUTOR: Mauro de Mesquita Souza Saraiva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira
Presidente
Universidade Federal da Paraíba

Profª. Dra. Patrícia Emília Naves Givisiez
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Lauro Santos Filho
Examinador
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp
Examinador
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Eloiza Helena Campana
Examinadora

Areia, 28 de setembro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA, filho de Adauto Domingos Saraiva e Maria da Conceição de Mesquita Souza Saraiva, nasceu no dia 19 de fevereiro de 1985 na cidade de Salvador – BA. Em março do ano de 2003, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Durante a graduação foi bolsista de extensão da Cavalaria do esquadrão de polícia (PM-BA) durante dois anos. Diplomou-se Médico Veterinário no ano de 2009. Em março de 2013, iniciou o curso de Mestrado em Ciência Animal no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal da Paraíba, na Área de Medicina Veterinária Preventiva, subárea Segurança Alimentar obtendo o título de Mestre em Ciência Animal no ano de 2015. No mesmo ano, iniciou o Doutorado em Zootecnia no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará. Foi contemplado com bolsa no *Global Innovation Initiative*, no *Infection Disease Molecular Epidemiology Laboratory* da Ohio State University - *College of Veterinary Medicine*, localizado no estado de OH-EUA, por quatro meses, posteriormente, no ano seguinte, foi contemplado com bolsa Capes pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, desenvolvendo parte de sua pesquisa no mesmo laboratório da *Ohio State University - College of Veterinary Medicine*-OH-EUA.

EPÍGRAFE

Emancipate yourselves from mental slavery;

None but ourselves can free our minds.

Have no fear for atomic energy,

Cause none of them can stop the time.

Bob Marley

À Silvana Cristina, minha noiva, por ser meu porto
seguro nessa longa jornada, a todo momento, a
todo custo... Por jamais me deixar desistir

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Somos parte de seres sociáveis, e como tal, nada fazemos sozinhos... Algumas pessoas foram fundamentais nessa trajetória árdua, longa, mas gratificante:

Agradeço a Deus, pelo dom da vida! Por me dar forças nos momentos de desilusões e ser o guia de minha vida.

A minha família, o alicerce de minha vida. A minha mãe Conceição a meu pai Adauto, por todo carinho, apoio e incentivo sempre que precisei. A minhas irmãs Mayara e Laiz por terem me dado o carinho e compreensão a todo o momento. Meu tio Luiz, um segundo pai, que sempre esteve a meu lado. A meus avós, Mesquita e Lindaura, por todo tempo e muito carinho dispensado a mim. Eles me fizeram compreender que amor é o alicerce da vida.

A Silvana, minha noiva, companheira, cúmplice... MEU AMOR! Sempre estive a meu lado em todas as minhas alegrias e, principalmente, em minhas tristezas. Minha Pequena, mas grande mulher.

A família LAPOA, em especial a Alexandre, Candice, Maylane, Laelia, Núbia e Priscyla que sempre me deram suporte para que o caminho fosse menos doloroso.

A meus amigos, amigos verdadeiros, que sempre estiveram a meu lado, não importando a distância ou situação... Sempre prontos a me apoiar, a ajudar no que fosse necessário.

A meu orientador, Professor Celso Oliveira por me dar oportunidade de crescer, como profissional e como pessoa. Pela amizade e conselhos valiosos.

A Professora Patrícia Givisiez por todo carinho e apoio, sempre. Palavras poucas, mas sempre doces.

Ao professor Oliveiro Caetano por estar a disposição para contribuir com meu projeto, com conselhos sempre pertinentes.

Ao professor Wondwossen Gebreyes por gentilmente me acolher em seu laboratório nos Estados Unidos, e compartilhar seu conhecimento.

A Amornthep Archawakulathep por toda sua amizade e apoio durante minhas estadias nos Estados Unidos.

Por fim, gostaria de agradecer à Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em especial ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (PDIZ), por me conceder a oportunidade de estudar e crescer profissionalmente, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsas de estudo.

Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui...

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	14
GENERAL ABSTRACT	16
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	18
CAPÍTULO I	20
Antimicrobianos na avicultura: uma revisão sobre a resistência e seus principais mecanismos ..	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA NA AVICULTURA E PRINCIPAIS RESISTÊNCIAS FENOTÍPICAS	25
2.1 <i>Escherichia coli</i>	25
2.2 <i>Campylobacter</i> spp.....	28
2.3 <i>Enterococcus</i> spp.....	30
2.4 <i>Salmonella</i> spp.	31
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE IMPORTÂNCIA PARA A AVICULTURA.....	35
3.1 Betalactâmicos	35
3.2 Aminoglicosídeos.....	39
3.3 Fluoroquinolonas	40
3.4 Tetraciclina.....	42
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO II	61
O uso sem prescrição de ceftiofur em pintos de um dia desencadeia o aumento, nas duas primeiras semanas pós-eclosão, da produção de ESBL por <i>E. coli</i> no intestino	62
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1 Incubação dos ovos	65
2.2 Instalações e dieta	66

2.3 Grupos experimentais.....	67
2.4 Colheita de amostras e análises microbiológicas.....	68
2.5 Suscetibilidade antimicrobiana.....	69
2.6 Detecção fenotípica de isolados produtores de beta-lactamases de espectro estendido ESBL	69
2.7 Extração de DNA.....	70
2.8 Detecção genotípica de isolados produtores de beta-lactamases de espectro estendido ESBL	71
2.9 Análise de relação genética por PCR	71
2.10 Análise dos dados.....	72
3. RESULTADOS.....	73
4. DISCUSSÃO	81
5. CONCLUSÃO	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
CAPÍTULO III.....	87
Avaliação experimental do tratamento da cama de frango na transferência horizontal de ESBL-plasmídeos em <i>E. coli</i>	87
RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
1. INTRODUÇÃO	90
2. MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1 Desenho experimental.....	92
2.2 Cepas bacterianas usadas no ensaio de conjugação	92
2.3 Determinação das taxas de conjugação e análises estatísticas	93
3. RESULTADOS.....	95
4 DISCUSSÃO	97
5 CONCLUSÃO	99
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
APÊNDICE.....	106
APÊNDICE A: Artigo publicado no periódico científico Plos One: Off-label use of ceftiofur in one-day chicks triggers a short-term increase of ESBLproducing <i>E. coli</i> in the gut.....	107

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em <i>Escherichia coli</i> isolados na avicultura nos últimos 5 anos.....	26
Tabela 2. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em <i>Campylobacter</i> spp. isolados na avicultura nos últimos 5 anos.....	28
Tabela 3. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em <i>Enterococcus</i> spp. isolados na avicultura nos últimos 5 anos.....	30
Tabela 4. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp. isolados na avicultura nos últimos 5 anos.....	32
Tabela 5. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados na avicultura nos últimos 5 anos.....	34

CAPÍTULO II

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar os genes de resistência antimicrobiana codificadores de ESBL, AmpC e <i>Enterobacterial Repetitive Intergeneric</i> (ERIC).....	71
Tabela 2. Resistência antimicrobiana das 57 <i>E. coli</i> cultivadas a partir de pintainhos que receberam ceftiofur (AG) e pintainhos que receberam apenas solução fisiológica (CG). Os isolados foram recuperados a partir de ágar MacConkey suplementado com ceftiofur (2mg/L)	72
Tabela 3. Perfis de resistência antimicrobiana de 57 <i>E. coli</i> resistentes ao ceftiofur, cultivadas de pintainhos que receberam ceftiofur cultivadas de pintainhos que receberam ceftiofur (AG) e pintainhos que receberam apenas solução fisiológica (CG).....	74
Tabela 4. Frequências dos perfis de resistência antimicrobiana entre 57 <i>E. coli</i> resistentes ao ceftiofur, cultivadas de pintainhos que receberam ceftiofur (AG) e pintainhos que receberam somente solução salina (CG).....	76
Tabela 5. Número de animais positivos para ESBL- <i>E. coli</i> identificados fenotipicamente pelo teste de sinergia de disco duplo.....	77

CAPÍTULO III

Tabela 1. Médias (em Log) das contagens de colônias bacterianas totais e transconjugantes das cepas de <i>E. coli</i> , entre os tratamentos utilizados nos dois materiais de cama: bagaço de cana e maravalha.....	96
Tabela 2. Médias (em Log) das taxas de conjugação de plasmídeos-R entre cepas de <i>E. coli</i> em ambos os materiais de cama: bagaço de cana e maravalha.....	97

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Ovos férteis arranjados para incubação.....	64
Figura 2. Disposição das caixas e seus respectivos tratamentos na sala experimental.....	65
Figura 3. Pintainhos alojados nas caixas experimentais.....	66
Figura 4. Esquema de isolamento e identificação dos isolados de <i>E. coli</i>	67
Figura 5. Dendrograma ilustrando similaridades genéticas entre ESBL- <i>E. coli</i> por ERIC-PCR. Key = Identificação do isolado; AG = grupo com administração de antimicrobiano - 0.2mL (2 mg/L) de ceftiofur; CG = grupo controle - 0.2mL de solução fisiológica.....	77
Figura 6. Gráfico da regressão binomial bayesiana da ocorrência de <i>E. coli</i> -ESBL ao longo dos dias experimentais, entre os dois grupos tratamentos: AG = grupo com administração de antimicrobiano - 0.2mL (2 mg/L) de ceftiofur; CG = grupo controle - 0.2mL de solução fisiológica.....	78

CAPÍTULO III

Figura 1. Desenho experimental de fatorial 2x5 com dois materiais de cama (bagaço de cana e maravalha e cinco tratamentos (controle, CaO, Superfosfato, CuSO ₄ e Al ₂ (SO ₄) ₃).....	91
Figura 2. Passo-a-passo do protocolo utilizado para o ensaio de conjugação.....	92

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA AVICULTURA: EFEITOS DO USO PROFILÁTICO DE CEFTIOFUR E DO TRATAMENTO QUÍMICO DA CAMA NA DISSEMINAÇÃO DE BETALACTAMASES

RESUMO GERAL

O uso de antimicrobianos na avicultura é uma prática comum ao redor do mundo, visando aumento da produtividade animal. Entretanto, o surgimento cada vez maior de espécies bacterianas resistentes a estas drogas tem preocupado produtores e consumidores de produtos avícolas. Bactérias Gram-positivas como *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*, e Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp., estão entre as principais espécies comumente isolada de frangos de corte e poedeiras, com alta resistência a antimicrobianos. Estas espécies são frequentemente descritas como resistentes a diferentes classes de antimicrobianos considerados de crítica importância a saúde animal e humana como cefalosporinas. Os mecanismos de resistência a essas drogas são bastante diversificados, tendo como principal mecanismo o enzimático, como as β -lactamases de espectro estendido codificadas por genes presentes em cromossomos e elementos móveis. Os genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{PSE} e *bla*_{CTX-M-1} são os mais reportados em bactérias isoladas da indústria avícola. Com isso, foram realizados dois experimentos no Laboratório Análise de Produtos de Origem Animal (LAPOA/CCA/UFPB). No capítulo II estão apresentados os dados do primeiro experimento objetivando avaliar o uso não prescrito de ceftiofur em pintainhos de um dia de idade, mimetizando o uso profilático comum em granjas comerciais juntamente com a vacina de Marek, e a ocorrência de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamase de espectro estendido. Foram utilizados 168 pintainhos divididos em grupos tratados com ceftiofur e não tratados. A aplicação de ceftiofur em pintainhos influenciou positivamente na ocorrência de ESBL nos isolados de *E. coli* recuperados (86%; $p < 0,001$). Todas as *E. coli* produtoras de ESBL apresentaram os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}. Nenhum isolado foi positivo para genes AmpC mediados por plasmídeos testados. A abordagem bayesiana demonstrou maiores probabilidades de ocorrências de *E. coli* produtores de ESBL nos grupos tratados com ceftiofur, bem como os dias 7 e 14, em comparação com o grupo não tratado e os outros dias experimentais, respectivamente. No capítulo III são apresentados dados referentes ao segundo

experimento, que objetivou avaliar os efeitos de resíduos químicos em diferentes materiais usados como cama de frango sobre a taxa de conjugação de plasmídeos-ESBL em *E. coli*. Foi utilizado um delineamento 2x5, com dois diferentes materiais na constituição da cama (bagaço de cana e maravalha) e cinco tratamentos (controle, cal virgem, sulfato de alumínio, sulfato de cobre e superfosfato). Os grupos sem adição de químicos demonstraram as maiores taxas de conjugação. Na cama de bagaço de cana demonstrou interação benéfica com uso de superfosfato ($p < 0,001$). Quando a maravalha foi usada como substrato, as menores taxas foram obtidas com uso de cal virgem e sulfato de cobre. O bagaço de cana apresentou menores taxas de conjugação de ESBL-plasmídeos. O uso de ceftiofur em pintainhos de um dia juntamente com a vacina de Marek eleva a ocorrência de *E. coli* resistentes em curto período. A presença de produtos químicos pode afetar a conjugação de ESBL-plasmídeos entre *E. coli*, apesar da influência de fatores ambientais sobre a transferência horizontal de elementos móveis.

Palavras-chave: antimicrobianos na avicultura, cefalosporinas, plasmídeos, resistência

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN POULTRY: EFFECTS OF THE CEFTIOFUR PROFILATIC USE AND THE CHEMICAL TREATMENT OF THE POULTRY LITTER ON THE BETALACTAMASES DISSEMINATION

GENERAL ABSTRACT

The antimicrobial use in poultry farming is a common practice around the world, aiming to increase animal productivity. However, the growing emergence of resistant bacterial species to these drugs has concerned poultry producers and consumers. Gram-positive bacteria as *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus aureus*, and Gram-negative bacteria as *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp., are among the main species commonly isolated from broilers and layers, with highest antimicrobial resistance. These species are often described as resistant to different antimicrobial classes include these considered of critical importance to animal and human health, as cephalosporins. The resistance mechanisms to these drugs are quite diverse, and the main of them is the enzymatic mechanism, such as extended-spectrum β -lactamases encoded by genes present in chromosomes and mobile elements. The *bla*_{TEM-1}, *bla*_{PSE} and *bla*_{CTX-M-1} genes are the most reported in isolated bactérias from the poultry industry. Two experiments were carried out at the Animal Origin Products Analysis Laboratory (LAPOA/CCA/UFPB). Chapter II presents data from the first experiment to evaluate the off-label use of ceftiofur in one-day-old chicks, mimicking common prophylactic use in poultry farms together with the Marek's vaccine, and the occurrence of β -lactamase-producing *Escherichia coli*. We used 168 chicks arranged into ceftiofur treated and untreated groups. The ceftiofur application in chicks positively influenced the ESBL occurrence in the recovered *E. coli* isolates (86%; $p < 0.001$). All ESBL-producing *E. coli* presented the *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} genes. No isolates were positive for plasmid-mediated AmpC genes tested in this study. The Bayesian approach showed greater probabilities of ESBL-producing *E. coli* occurrences in the ceftiofur-treated groups, as well as days 7 and 14, compared to the untreated group and the other experimental days, respectively. In Chapter III data are presented referring to the second experiment that aimed to evaluate the effects of chemical residues on different materials

used as poultry litter on the conjugation rate of ESBL-plasmids in *E. coli*. It was used a 2x5 design, with two different litter materials (cane bagasse and wood shavings) and five treatments (control, quicklime, aluminum sulphate, copper sulphate and superphosphate). Groups with no chemical additions demonstrated higher conjugation rates. In the cane bagasse litter showed beneficial interaction with the use of superphosphate ($p < 0.001$). When the wood shavings were used as a substrate, the lowest rates were obtained with the use of quicklime and copper sulphate. Lower conjugation rates of ESBL-plasmids were obtained in cane bagasse. The ceftiofur use in one-day-old chicks together with the Marek vaccine raises the resistant *E. coli* occurrence in short-term. The chemical presence can affect the conjugation of ESBL-plasmids between *E. coli*, despite the influence of environmental factors on the horizontal transfer of mobile elements.

Keywords: antimicrobials in poultry, cephalosporins, plasmids, resistance

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A produção industrial avícola representa, hoje, um terço de toda produção de carne global, para atender à demanda de consumidores cada vez mais exigentes em um mercado bastante competitivo. Como consequência à busca de alta produtividade, o uso de antimicrobianos, sejam como promotor de crescimento ou como medida profilática, tem sido uma prática recorrente na produção de frangos. Dentre estes, destaca-se a aplicação do ceftiofur, administrado juntamente com a vacinação no primeiro dia de vida de pintainhos. Esta prática visa, principalmente, a prevenção de doenças por *Enterobacteriaceae*, como salmoneloses e colibaciloses.

O ceftiofur é um antimicrobiano da classe dos β -lactâmicos pertencente à terceira geração das cefalosporinas. Com uso licenciado para medicina veterinária, o ceftiofur é um fármaco de amplo espectro empregado, principalmente, no combate de bactérias Gram-negativas. Seu mecanismo de ação consiste em bloquear a síntese da parede celular bacteriana. Entretanto, algumas espécies de enterobactérias produzem enzimas chamadas β -lactamases, capazes de inativar as cefalosporinas tornando-as sem efeito. Existe uma gama de variedades de β -lactamases distintas, resultado da pressão seletiva imposta por uma gama de diferentes β -lactâmicos introduzidos no uso clínico nas últimas décadas.

A disseminação da resistência às cefalosporinas também é variada. Os genes que codificam enzimas β -lactamases podem estar presentes tanto no cromossomo bacteriano como em elementos móveis, tais como plasmídeos. Dessa forma, a perpetuação da resistência ocorre não só de forma vertical, transferindo-a à progênie, como também de forma horizontal havendo transferência destes genes entre indivíduos da mesma espécie ou para espécies diferentes de bactérias.

Nesse contexto, o uso de cefalosporinas na produção animal tem sido associado com aumento da resistência à essas drogas em animais e produtos. Uma vez que as bactérias resistentes não só são capazes de se multiplicar na presença destes fármacos, como também elas podem, rapidamente, ser transmitidas de uma ave para outra, seres humanos e ambiente. Assim, o impacto sobre o crescente número de agentes patogênicos resistentes a drogas utilizadas no tratamento de infecções em seres

humanos é, possivelmente, um dos temas mais controversos e tem gerado intenso debate, não apenas pela comunidade científica, mas pela sociedade mundial.

Estudos têm evidenciado a associação positiva entre a prevalência de bactérias resistentes em frangos e seres humanos, bem como o aumento do uso de antimicrobianos na avicultura, seja como promotor de crescimento ou como mecanismo profilático. No entanto, a relação causa efeito da aplicação de agentes antimicrobianos, sobretudo das subdosagens, sobre a prevalência e disseminação de patógenos resistentes, ainda precisam ser melhor compreendidos. Ao que se sabe, o uso não terapêutico de antimicrobianos propiciam condição ideal para emergência e disseminação de bactérias resistentes no âmbito da avicultura. Diante disto, assumimos a hipótese que a aplicação não prescrita de ceftiofur pode propiciar precocemente a ocorrência de *Escherichia coli* em pintainhos; elementos móveis de resistência a cefalosporinas podem ser transmitidos por conjugação entre *E. coli* no ambiente da produção de frangos.

O presente trabalho foi construído em três capítulos distintos, no qual o primeiro é composto por uma revisão de literatura, em que foram abordados temas explorados no decorrer dos outros capítulos: bactérias de importância na avicultura, principais resistências fenotípicas em isolados oriundo de aves e mecanismos de resistência a antimicrobianos.

No segundo capítulo constam os dados de experimento conduzido no Laboratório de Análise de Produtos de Origem Animal (LAPOA/CCA/UFPB). Neste estudo, objetivou-se avaliar a utilização de ceftiofur em pintainhos de um dia de vida e o efeito na ocorrência de *E. coli* resistentes entre os dias pós eclosão e 15º dia de vida.

No terceiro e último capítulo estão apresentados os dados de experimento de transferência horizontal de plasmídeos de resistência a cefalosporinas, por conjugação, em camas de frango tratadas com produtos químicos. O trabalho foi, também, desenvolvido no Laboratório de Análise de Produtos de Origem Animal (LAPOA/CCA/UFPB).

CAPÍTULO I

Antimicrobianos na avicultura: uma revisão sobre a resistência e seus principais mecanismos

Antimicrobianos na avicultura: uma revisão sobre a resistência e seus principais mecanismos

RESUMO

O consumo de carne de frangos representa a principal fonte de proteína para muitas famílias em todo o mundo e, portanto, é a carne mais consumida ao redor do mundo. Ainda são escassos os dados avaliando o uso indiscriminado de antimicrobianos, seja terapêutico ou profilático, em relação a bactérias isoladas da avicultura, bem como a resistência adquirida por este uso. Frangos e produtos avícolas podem ser reservatório de bactérias resistentes, que podem causar doenças aos animais e serem transmitidas ao homem. Aminoglicosídeos, β -lactâmicos e tetraciclínas estão entre as classes de antimicrobianos mais utilizadas na avicultura. O objetivo deste trabalho foi revisar a resistência aos antimicrobianos de importância à saúde animal e humana, e compreender os principais mecanismos de resistência em bactérias isolados de frangos e produtos avícolas.

Palavras-chave: aminoglicosídeos; avicultura; β -lactâmicos; fluoroquinolonas; tetraciclínas.

Antimicrobials in poultry: a review on resistance and its main mechanisms

ABSTRACT

The consumption of chicken meat represents the main protein source for many families worldwide and therefore is the most consumed meat around the world. Data on the indiscriminate use of antimicrobials, either therapeutic or prophylactic in relation to bacteria isolated from poultry, as well as the resistance acquired by this use are still scarce. Chickens and poultry products can be resistant bacteria reservoirs that can cause disease in animals and be transmitted to humans. Aminoglycosides, β -lactam and tetracycline antibiotics are among the most commonly used classes in poultry. The objective of this work was to review the resistance to antimicrobials of importance to animal and human health, and to understand the main mechanisms of resistance in bacteria isolated from chickens and poultry products.

Keywords: aminoglycosides; β -lactam; fluoroquinolone; poultry; tetracycline

1. INTRODUÇÃO

O consumo de proteína de origem animal configura a base da alimentação humana. Nesse contexto, a produção de aves representa cerca de um terço da produção de carne global (FAO, 2016). Segundo o Serviço de Agricultura Estrangeira (FAS/USDA) Brasil, EUA, União Europeia e China são os principais produtores de carnes de frango no mundo (USDA, 2018).

Para atingir esse nível de produção, o uso subterapêutico de antimicrobianos adicionados à dieta (BARROS, 2012) ou juntamente com a vacinação (WEBSTER, 2009) são utilizados para prevenção de doenças e melhora do desempenho. Uma grande variedade dessas drogas é utilizada na avicultura (LANDONI; ALBARELLOS, 2015; PAGE; GAUTIER, 2012), principalmente em países em desenvolvimento, como China, Brasil e Índia (VAN BOECKEL et al., 2015).

Alguns antimicrobianos são tidos como criticamente importantes à saúde humana (WHO, 2017). Dessa forma, o uso não terapêutico destas drogas torna-se uma questão de saúde global, uma vez que o uso de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal está diretamente relacionado com o aumento da resistência (BARON et al., 2014; GARCIA-MIGURA et al., 2014; GIBBONS et al., 2016; NHUNG et al., 2016). O emprego destes pode ser a chave para o aparecimento da resistência na avicultura, pois a aplicação de drogas na produção de aves promove a eliminação de bactérias sensíveis e termina por selecionar as resistentes. Dessa maneira, os isolados remanescentes tornam-se predominantes e transferem seus genes de resistência, tanto aos descendentes quanto a outras espécies bacterianas (GOULD, 2008).

Uma grande variedade de bactérias resistentes a antimicrobianos são frequentemente recuperadas em linhagens de frangos e poedeiras tais como *Campylobacter* spp. (GRANT; HASHEM; PARVEEN, 2016; KAAKOUSH et al., 2015; SAHIN et al., 2015), *Enterococcus* spp. (BORTOLAIA; ESPINOSA-GONGORA; GUARDABASSI, 2016; BOULIANNE et al., 2016; KATAKWEBE et al., 2017), *Escherichia coli* (BOULIANNE et al., 2016; SIMONEIT et al., 2015), *Salmonella* spp. (CUNHA-NETO et al., 2018; DHANANI et al., 2015; GRANT;

HASHEM; PARVEEN, 2016) e *Staphylococcus aureus* (BORTOLAIA et al., 2016; NWORIE et al., 2017).

Nosso trabalho tem por objetivo revisar relatos feitos entre 2014 e 2018 sobre a resistência antimicrobiana com potencial risco à saúde humana, bem como os principais mecanismos dessa resistência em isolados de frangos e produtos avícolas.

2. BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA NA AVICULTURA E PRINCIPAIS RESISTÊNCIAS FENOTÍPICAS

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) é uma espécie de bacilo Gram-negativo de particular importância à tríade homem-animal-ambiente. *E. coli* são frequentemente estudadas como marcadores de resistência a antimicrobianos, principalmente pela capacidade de algumas cepas carregarem diversos genes de resistência e funcionarem como fonte à disseminação para outras espécies (EFSA, 2016; KHEIRI; AKHTARI, 2016; NHUNG et al., 2016).

Em aves domésticas, *E. coli* resistentes a antimicrobianos colonizam o trato gastrointestinal e podem causar doenças oportunistas, bem como serem transmitidas a homens e outros animais (MAJOWICZ et al., 2014; OLSEN et al., 2014). Adicionalmente, *E. coli* patogênica aviária (APEC) é agente causador da colibacilose, facilmente transmitida por via oral ou inalação, impondo perdas econômicas em produções avícolas em todo o mundo (BARBIERI et al., 2017; GUABIRABA; SCHOULER, 2015; PASQUALI et al., 2015).

A ocorrência dessas bactérias em galpões de frango podem ser um problema não só econômico, mas de saúde pública. Isolados de *E. coli* eliminados por frangos podem ser disseminados ao ambiente, seja por água, ar ou vetores como moscas (BLAAK et al., 2014; BLAAK et al., 2015) conferindo elevada probabilidade de contaminação a outras espécies animais e seres humanos, embora o risco de infecção por isolados patogênicos pareça ser baixo (MENDONÇA et al., 2016).

Especial atenção tem sido direcionada a isolados capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração como ceftiofur, ceftriaxona e ceftazidima. Os animais de produção são considerados reservatórios de *E. coli* produtora de ESBL (NGUYEN et al., 2016). Estima-se que um terço dos isolados oriundos de produtos avícolas podem carrear resistência a cefalosporinas, sendo que enzimas CTX-M-1 e 15 são as mais descritas em *E. coli* obtidas de frangos clinicamente saudáveis (MAAMAR et al., 2016).

O ambiente de criação de frangos também propicia a proliferação de bactérias. As camas de frango funcionam como meio de cultura formado por material da cama, dejetos dos animais, além de ração e água derramados pelas aves (LJUBOJEVIC et al.,

2016). Frequentemente isolados resistentes de *E. coli* são recuperadas de camas de frangos, frescas ou tratadas, embora as últimas demonstrem estar associados a estirpes resistente a múltiplas drogas (SUNG et al., 2017). Ainda, as camas de frango podem funcionar como reservatório de genes de resistência. Plasmídeos carregando genes *bla_{CMY}* podem ser disseminados entre *E. coli* em camas de frango, embora a eficiência de disseminação reduza na ausência de antibióticos (DAME-KOREVAAR et al., 2017).

Na Tabela 1 estão os dados de resistência coletados a partir de 15 trabalhos com *E. coli* isolados de frangos e carne de frango entre os anos de 2014 a 2018. As mais elevadas taxas de resistências foram para aminoglicosídeos, grupos de β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas) e fluoroquinolonas; em alguns casos foi relatado 100% de resistência a esses antimicrobianos (AMIR et al., 2017; AWOGBEMI; MOSES; EZEKIEL OLUGBENGA, 2018; BROWER et al., 2017; CHISHIMBA et al., 2016; DONADO-GODOY et al., 2014; FERREIRA et al., 2018; HASMAN et al., 2015; HUSSAIN et al., 2017; JOHNSON et al., 2017; KOGA et al., 2015; LAMBRECHT et al., 2018; MONTE et al., 2017; NGUYEN et al., 2015; OSMAN et al., 2018; SARAIVA et al., 2018).

Tabela 1. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em *Escherichia coli* isolados na avicultura nos últimos 5 anos.

Estudo	Região	Referência	Ano do estudo	Nº de isolados	Perfil de resistência (%)
1	África	Chishimba et al.	2016	77	AMP (100), C (57,1), CAZ (100), CIP (48,1), GM (37,7), NAL (48,1), NOR (54,5), S (20,8), SXT (41,6), T (59,7)
2	África	Awogbemi et al.	2018	10	AMC (100), AMP (90), AMX (100), C (90), ERY (80) GM (50), OB (80), P (80), S (70), T (90)
3	África	Osmam et al.	2018	30	AMP (90), AMX (90), C (53,3), CE (0), CEF (56,7), CIP (30), CLD (96,7), COL (0), DOX (100), ENR (60), ERY (96,7), FOS (0), GM (10), NEO (73,3), NOR (93,3), OT (100), PEF (80), RIF (86,7), S (93,3), SP (86,7), SPT (100), SXT (76,7), UB (90)
4	América do Norte	Johnson et al.	2017	75	AMC (21), AMP (41), C (7), CEF (12), CIP (1,3), CRO (13), FOX (12), GM (55), KA (13), S (47), SUL (63), SXT (12), T (51)
5	América do Sul	Donado-Godoy et al.	2014	164	AMP (55), CIP (23), CTX (24)
6	América do Sul	Koga et al.	2015	39	AMC (28,2), AMP (100), C (17,9), CAZ (5,1) CIP (43,6), CTX (94,9), ENR (41), GM (43,6), KZ (100), NAL (74,4), NIT (10,3), NOR (30,8), SXT (33,3), T (97,4)
7	América do Sul	Monte et al.	2017	8	AMX (50), CEF (87,5), COL (62,5), CRO (100), CTX (100), FOX (37,5), GM (62,5), PB (87,5), SXT (12,5), T (50)
8	América do Sul	Ferreira et al.	2018	36	AMC (100), AZI (44,4), C (47,2), CAZ (66,7), CIP (100), CTX (100), FEP (13,9), FOX (72,2), GM (30,6), LEV (94,4), NAL (100), SXT (30,6), T (88,9)
9	América do Sul	Saraiva et al.	2018	57	AMC (14), ATM (42,1), C (35,1), CAZ (17,5), CIP (40,4), CRO (94,7), CTX (100), GM (8,8), SXT (54,5), T (100)
10	Ásia	Nguyen et al.	2015	895	AK (5,4), AMC (47,9), AMP (86), C (68,1), CAZ (2), CIP (32,5), CRO (2,5), GM (19,9), SXT (69,7), T (93,4)
11	Ásia	Brower et al.	2017	1556	AMP (43,8), C (7,1), CFX (4), CIP (39,4), COT (42,2), GM (12,9), IMP (0), NAL (86,1), NIT (18,4), T (47)
12	Ásia	Amir et al.	2017	450	AMX (55,1), AZI (39,8), C (56,2), CE (64,7), CIP (72,7), CRO (9,1), GM (59,6), NAL (67,6), OT (99,3), P (80,7)
13	Ásia	Hussain et al.	2017	168	C (8), CAZ (37), CIP (70), COT (45), FOS (4), GM (32), T (84)
14	Europa	Hasman et al.	2015	5	AK (0), ATM (100), CAZ (100), CIP (20), CTX (100), COL (100), DOR (0), DOX (40), ETP (0), FEP (0), GM (0), IMP (0), LEV (20), MEM (0), MH (20), PB (100), SXT (60), T (0), TGC (0), TIM (40), TZP (0)
15	Europa	Lambrecht et al.	2017	35	AMP (100), AZI (2,9), C (42,9), CAZ (62,9), CIP (91,4), COL (2,9), CTX (65,7), GM (2,9), MEM (0), NAL (54,3), SUL (80), T (62,9), TGC (0), TMP (74,3)

AK, amicacina; AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina; ATM, aztreonam; AZI, azitromicina; C, cloranfenicol; CAZ, ceftazidima; CE, cefradina; CEF, ceftiofur; CFX, cefuroxima; CIP, ciprofloxacina; CLD, clindamicina; COL, colistina; COT, co-timoxazol; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; DOR, doripenem; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; ERY, eritromicina; ETP, ertapenem; FEP, cefepima; FLM, flumequina; FOS, fosfomicina; FOX, cefoxitina; GM, gentamicina; IMP, imipenem; KA, kanamicina; KZ, cefazolina; LEV, levofloxacina; MEM, meropenem; MH, minociclina; NAL, ácido nalidíxico; NEO, neomicina; NIT, nitrofurantoina; NOR, norfloxacina; OB, cloxacilina; OT, oxitetraciclina; P, penicilina; PB, polimixina B; PEF, pefloxacina; RIF, rifampicina; S, estreptomicina; SP, espiramicina; SPT, espectinomina; SUL, sulfametoxazol; SXT, sulfametoxazol/trimetoprima; T, tetraciclina; TGC, tigeciclina; TIM, ticarcilina/ ácido clavulânico; TMP, trimetoprima; TZP, piperacilina/ tazobactam.

2.2 *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* é composto por espécies de bactérias conhecidas por causar doenças em animais e humanos (SILVA et al., 2011), sendo um dos principais causadores de doenças veiculadas por alimentos. Espécies como *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) e *C. coli* são comumente encontrados colonizando frangos, que funcionam como importante reservatório para infecções em humanos, principalmente crianças (ELTRAS et al., 2015).

Em nove recentes estudos com isolados de *Campylobacter* spp., entre 2014 e 2018, resistência antimicrobiana foi identificada em frangos de corte (DONADOGODOY et al., 2014; KARIKARI et al., 2017; KASSEM et al., 2017; VINUEZA-BURGOS et al., 2017), poedeiras (KARIKARI et al., 2017), carcaça de frango (HAN et al., 2016; KARIKARI et al., 2017; PANZENHAGEN et al., 2016; WIECZOREK; OSEK, 2015) e carne de frango ou miúdos (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2018; HAN et al., 2016; KOTTAWATTA et al., 2017). Ao todo, mais de 2000 isolados de *Campylobacter* foram analisados nesses estudos e elevado perfil de resistência foi registrado, incluindo contra aminoglicosídeos (gentamicina, 0 a 100%), β -lactâmicos (ampicilina, 8,8 a 100%; cefalexina, 85,7 a 100%), quinolonas (ácido nalidíxico, 38,5 a 100%; ciprofloxacina, 7,1 a 100%), macrolídeos (eritromicina, 0,9 a 100%) e tetraciclina (24,4 a 100%) (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em *Campylobacter* spp. isolados na avicultura nos últimos 5 anos.

Estudo	Região	Referência	Ano do estudo	Nº de isolados	Perfil de resistência (%)
1	África	Karikari et al.	2017	<i>C. jejuni</i> 39	AMP (100), C (84,6), CIP (69,2), CLX (100), CTX (87,2), ERY (100), GM (23,1), KA (28,2), NAL (38,5), NOR (48,7), SXT (92,3), T (100)
				<i>C. coli</i> 14	AMP (100), C (64,3), CIP (64,3), CLX (85,7), CTX (85,7), ERY (100), GM (0), KA (28,6), NAL (7,4), NOR (0), SXT (92,9), T (92,9)
				<i>C. lari</i> 9	AMP (100), C (55,6), CIP (100), CLX (100), CTX (100), ERY (100), GM (33,3), KA (33,3), NAL (100), NOR (77,8), SXT (88,9), T (100)
2	América do Norte	Kassem et al.	2017	<i>C. jejuni</i> 45	CIP (15,6), ERY (20), S (11,1), T (64,4), TYL (33,3)
				<i>C. coli</i> 155	CIP (7,1), ERY (26,5), S (10,3), T (66,5), TYL (28,4)
3	América do Sul	Donado-Godoy et al.	2014	<i>C. jejuni</i> 29	CIP (97), ERY (21), T (83)
4	América do Sul	Panzenhagen et al.	2016	<i>C. jejuni</i> 44	CIP (100), ENR (100)
				<i>C. coli</i> 38	CIP (100), ENR (100)
5	América do Sul	Vinueza-Burgos et al.	2017	<i>C. jejuni</i> 48	CIP (97,9), ERY (4,2), GM (2,1), NAL (100), S (8,4), T (83,4)
				<i>C. coli</i> 170	CIP (100), ERY (25,8), GM (1,2), NAL (99,3), S (11,2), T (67,6)
6	Ásia	Han et al.	2016	<i>C. jejuni</i> 160	CIP (88,1), CLD (68,1), ERY (14,3), FFN (16,3), GM (47,5), LEV (78,1), S (43,8), T (79,4)
				<i>C. coli</i> 130	CIP (100), CLD (98,5), ERY (93,5), FFN (8,5), GM (90,8), LEV (98,5), S (17,8), T (98,5)
7	Ásia	Kottawatta et al.	2017	<i>C. jejuni</i> 20	AMP (45), C (0), CIP (80), CLA (0), ERY (5), GM (10), NAL (80), NEO (10), S (5), SUL (0), T (85), TUL (5)
				<i>C. coli</i> 45	AMP (8,8), C (2,2), CIP (84,4), CLA (6,6), ERY (11,1), GM (2,2), NAL (84,4), NEO (8,8), S (4,4), SUL (2,2), T (24,4), TUL (6,6)
8	Europa	Wieczorek e Osek	2015	<i>C. jejuni</i> 576	CIP (74,8), ERY (0,9), T (46,5)
				<i>C. coli</i> 575	CIP (88,3), ERY (4), T (65,7)
9	Europa	García-Sánchez et al.	2018	<i>C. jejuni</i> 55	AZI (96), CIP (100), ERY (100), GM (100), NAL (100), T (98)
				<i>C. coli</i> 19	AZI (63), CIP (79), ERY (63), GM (95), NAL (100), T (100)
				<i>C. lari</i> 2	AZI (0), CIP (100), ERY (0), GM (50), NAL (100), T (100)

AMP, ampicilina; AZI, azitromicina; C, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; CLA, claritromicina; CLD, clindamicina; CLX, cefalexina; CTX, cefotaxima; ENR, enrofloxacina; ERY, eritromicina; FFN, florfenicol; GM, gentamicina; KA, kanamicina; LEV, levofloxacina; NAL, ácido nalidíxico; NEO, neomicina; NOR, norfloxacina; S, estreptomicina; SUL, sulfametoxazol; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprima; T, tetracycline; TUL, tulatromicina.

2.3 *Enterococcus* spp.

Habitantes naturais do trato gastrointestinal de homens e animais, as bactérias do gênero *Enterococcus* são potenciais contaminantes do meio ambiente e de alimentos como carne de frango (TORRES et al., 2018). Embora diferentes cepas deste gênero sejam descritas como patogênicas em frangos, *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina merecem especial atenção de pesquisadores por causarem perdas econômicas na produção animal e doenças nosocomiais em humanos (DOLKA et al., 2016; DOLKA et al., 2017; KHAN et al., 2015;).

Em trabalhos coletados entre 2014 e 2017, espécies de *Enterococcus* foram identificados em frangos de corte e poedeiras (DONADO-GODOY et al., 2014; MAASJOST et al., 2015; NGBEDE et al., 2016; STEPIEŃ-PYŚNIAK et al., 2016; USUI et al., 2014) e carne de frango (CAVACO et al., 2017; KILONZO-NTHENGE et al., 2015; TYSON et al., 2017), com frequências entre 30,7 a 92%.

Elevados níveis de resistências (Tabela 3) foram encontrados contra drogas das classes dos aminoglicosídeos (estreptomicina, 5 a 81,8%), das tetraciclinas (doxiciclina, 67,3%; tetraciclina, 7,5 a 82%) e das quinolonas (ciprofloxacina 2,5 a 97%; enrofloxacin, 17,9 a 69%). Resistência à vancomicina foi baixa 0,1 a 2%, com níveis mais elevados obtidos em frangos acometidos com osteomielite vertebral (BRAGA et al., 2017). Esta baixa resistência pode estar associada à descontinuidade do uso da avoparcina na produção de aves. A resistência ainda existente pode estar relacionada isolados de *Enterococcus faecium* ST842, co-resistentes à tetraciclina (BORTOLAIA et al., 2015).

Tabela 3. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em *Enterococcus* spp. isolados na avicultura nos últimos 5 anos.

Estudo	Região	Referência	Ano do estudo	Nº de isolados	Perfil de resistência (%)
1	África	Ngbede et al.	2016	53	AMP (43,4), C (9,4), CIP (11,3), ERY (73,5), GM (47,1), QD (9,4), RIF (15,1), S (47,1), T (81,1), VAN (0)
2	América do Norte	Kilonzo-Nthenge et al.	2015	132	AK (19,7), AMC (10,6), AMP (14,4), AZI (6,8), C (3), CEC (3), ERY (62,9), FOX (7,6), KA (47), P (52,3), S (81,8), T (44,7)
3	América do Norte	Tyson et al.	2017	5455	C (0,3), CIP (17,8), DAP (1,9), ERY (28,1), GM (6,6), KA (19,8), LZD (0,1), NIT (24,7), P (13,3), QD (20,5), S (16,6), T (60), TGC (0,1), TYL (27,2), VAN (0)
4	América do Sul	Donado-Godoy et al.	2014	<i>E. faecalis</i> 121 <i>E. faecium</i> 60	AMP (0), CIP (32), ERY (86), VAN (2) AMP (0), CIP (33), ERY (62), QD (60), VAN (0)
5	América do Sul	Cavaco et al.	2017	<i>E. faecalis</i> 40	C (2,5), CIP (2,5), ERY (7,5) FFC (2,5), GM (2,5), KA (2,5), LZD (7,5), S (5), T (7,5), TZD (7,5)
6	América do Sul	Braga et al.	2017	<i>E. faecalis</i> 12	AMP (0), AMX (0), BAC (0), CEF (8,3), GM (33,3), NEO (25), PNV (0), VAN (8,3)
7	Ásia	Usui et al.	2014	<i>E. faecalis</i> 117	AMP (0), C (27,4), ENR (17,9), ERY (70,9), GM (11,1), KA (37,6), MY (73,5), OT (69,2), S (51,3), VAN (0)
8	Europa	Maajost et al.	2015	<i>E. faecalis</i> 126 <i>E. faecium</i> 18	AMC (0), AMP (0), C (8), CIP (5), ERY (44), GM (44), MY (99), P (0), T (82), TYL (44), VAN (0) AMC (17), AMP (28), C (6), CIP (56), ERY (61), GM (72), MY (72), P (44), T (67), TYL (56), VAN (0)
9	Europa	Stepien-Pysnick	2016	911	AMC (4), AMX (4,4), DOX (67,3), ENR (69,4), FFC (15,7), MY (56,1), SXT (88), TYL (71,4), VAN (0,1)

AK, amicacina; AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina; AZI, azitromicina; BAC, bacitracina; C, cloranfenicol; CEC, cefaclor; CEF, ceftiofur; CIP, ciprofloxacina; DAP, daptomicina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; ERY, eritromicina; FFC, florfenicol; FOX, ceftiofur; GM, gentamicina; KA, kanamicina; LZD, linezolida; MY, lincomicina; NEO, neomicina; NIT, nitrofurantoína; OT, oxitetraciclina; P, penicilina; PNV, penicilina/novobiocina; QD, quinupristina/ dalfopristina; RIF, rifampicina; S, estreptomicina; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprima; T, tetraciclina; TGC, tigeciclina; TYL, tilosina; TZD, tedizolid; VAN, vancomicina.

2.4 *Salmonella* spp.

Doenças causadas por salmoneloses acometem centenas de pessoas ao redor do mundo, causando febres altas e diarreias, podendo levar à morte (WHO, 2018). Diversos sorotipos são encontrados em alimentos como carne de frango e ovos, considerados como a principal fonte de infecção e preocupação a saúde pública (ANTUNES et al., 2016; BAE; CHENG; KHAN, 2015; NHUNG et al., 2018). Em frangos, *Salmonella* spp. resistentes a antimicrobianos não só causam prejuízos econômicos, como põem em risco fazendeiros e tratadores (AGADA et al., 2014; HOFFMANN; BATZ; MORRIS, 2012; SCHARFF et al., 2016).

O elevado e diversificado nível de resistência antimicrobiana foi identificado em aproximadamente 4000 isolados, em 14 estudos publicados entre 2014 e 2018 (Tabela 4). β -lactâmicos (amoxicilina, 91,6%; ampicilina, 100%; penicilina G, 100%), macrolídeos (eritromicina, 100%), quinolonas (ácido nalidíxico, 95,2%), sulfonamidas (sulfametoxazol, 100%) e tetraciclina (93%) apresentaram as maiores resistências, enquanto as maiores sensibilidades foram obtidas para os aminoglicosídeos (4%, espectinomicina e 0,2%, gentamicina).

Tabela 4. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. isolados na avicultura nos últimos 5 anos.

Estudo	Região	Referência	Ano do estudo	Nº de isolados	Perfil de resistência (%)
1	África	Abd-Elghany et al.	2015	166	AMP (74,7), AMX (91,6), C (47), CIP (19,3), ERY (100), GM (1,2), KA (9,6), NAL (95,2), NEO (61,4), NOR (30,1), OT (89,2), P (92,8), S (67,5), SUL (83,1)
2	África	Zishiri et al.	2016	102	AMP (47), AMX (31), C (31), ERY (18), GM (48), KA (74), S (12), SXT (84,3), T (93), TMP (78,4)
3	África	Egualé	2018	26	AMC (42,3), AMP (42,3), C (42,3), CFN (46,2), CIP (7,7), FOX (0), GM (7,7), KA (42,3), NAL (19), NEO (11,5), NIT (26,7), S (92,3), SUL (92,3), SXT (3,9), T (30,8), TMP (3,9)
4	América do Norte	Ladely et al.	2016	S. Kentucky 600	AK (0), AMC (15,3), AMP (16,7), C (2), CEF (14,8), CIP (0), CRO (15,2), FOX (14,3), GM (2), KA (1,3), NAL (0,3), S (46,5), SUL (3,5), SXT (0,2), T (50)
5	América do Norte	Nisar et al.	2017	19	AMC (15,8), AMP (10,5), AZI (0), C (5,2), CEF (5,2), CIP (0), FOX (10,5), GM (10,5), NAL (0), S (21,1), SUL (21,1), SXT (0), T (21,1)
6	América do Sul	Donado-Godoy et al.	2014	39	AMP (82), CEF (74), CIP (69), CTX (69)
7	América do Sul	Vinueza-Burgos et al.	2016	62	AMP (67,7), C (64,5), CAZ (6,5), CIP (83,9), COL (16,1), CTX (71), FFC (67,7), GM (66,1), KA (51,6), NAL (85,5), S (79), SUL (88,7), T (80,6), TMP (80,6)
2	América do Sul	Zishiri et al.	2016	24	AMP (100), AMX (83), C (4,2), ERY (62,5), GM (12,5), KA (16,7), S (12,5), SXT (50), T (83), TMP (66,7)
8	América do Sul	Cunha-Neto et al.	2018	31	AMP (25), AZI (21,8), C (3,1), CEF (6,3), CFN (25), CIP (0), ENR (0), FFC (0), FOX (18,8), GM (3,1), NAL (0), NIT (0), S (0), SUL (100), SXT (75), T (9,4), TMP (87,5)
9	Ásia	Thung et al.	2016	11	AMC (0), AMP (72,7), AMX (27,3), CAZ (0), CFZ (27,3), CIP (27,3), ERY (100), GM (0), KA (0), NAL (9,1), P (100), S (9,1), T (0), TMP (0), VAN (100)
10	Ásia	Trongjit et al.	2017	375	AMP (70,7), C (10,7), CAZ (4,3), CIP (0,6), CPD (4,9), CTX (3,8), GM (2,9), S (28), SUL (69,5), T (26), TMP (29,6)
11	Ásia	Uddin et al.	2018	150	AMC (30), AMP (75), AZI (70), BAC (56), C (41), CE (0), CIP (4), CRO (0), ERY (40), FEP (0), KA (8), NAL (50), NEO (80), NV (74), S (31), SPT (4), T (89), TZP (0)
12	Europa	de Jong et al.	2014	42	AMC (2,9), AMP (35,4), C (3,3), CIP (0), COL (10,4), CTX (13,1), GM (0,2), NAL (22,8), S (24,3), SXT (26,8), T (15)
13	Europa	Franco et al.	2015	42	AMP (78,6), C (4,8), CIP (83,3), CTX (71,4), GM (2,4), KA (40,5), NAL (83,3), S (19), SUL (85,7), T (85,7), TMP (83,3)
14	Europa	EFSA	2016	2210	AMP (19,1), AZI (1,9), C (4), CAZ (2,6), CIP (53,5), COL (8,3), CTX (2,3), GM (6,6), NAL (48,7), SUL (45,1), T (40,4), TGC (9,3), TMP (16,9)

AK, amicacina; AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina; AZI, azitromicina; BAC, bacitracina; C, cloranfenicol; CAZ, ceftazidima; CE, cefradina; CEF, ceftiofur; CFN, cefalotina; CFZ, cefazolina; CIP, ciprofloxacina; CLX, cefalexina; COL, colistina; CPD, cefpodoxima; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; ENR, enrofloxacina; ERY, eritromicina; FEP, cefepima; FFC, florfenicol; FOX, ceftiofur; GM, gentamicina; KA, kanamicina; NAL, ácido nalidíxico; NEO, neomicina; NIT, nitrofurantoina; NOR, norfloxacina; NV, novobiocina; OT, oxitetraclina; P, penicilina; S, estreptomicina; SP, espiramicina; SPT, espectinomicina; SUL, sulfametoxazol; SXT, sulfametoxazol/trimetoprima; T, tetraciclina; TGC, tigeciclina; TMP, trimetoprima; TZP, piperacilina/tazobactam; VAN, vancomicina.

2.5 *Staphylococcus aureus*

Agentes oportunistas e causadores de doenças nosocomiais, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) podem ser responsáveis, por condições que variam desde brandas

lesões cutâneas a óbitos por endocardites (TONG et al., 2015). Existe ainda maior preocupação com a emergente disseminação das cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), frequentemente encontradas em humanos e animais, incluindo frangos (PETON; LE LOIR, 2014).

Cepa de *S. aureus* são frequentemente encontradas em frangos e podem ser transmitidos a humanos com contato ou através de produtos como carne (JAMROZY et al., 2012; VERKADE; KLUYTMANS, 2014).

Na Tabela 5, estão sumarizados os resultados de resistência a antimicrobianos de *S. aureus* obtidos em trabalhos entre 2015 e 2018. As maiores resistências foram encontradas para amoxicilina (100), amoxicilina + ácido clavulânico (5 a 80%), ampicilina (5,9 a 100%), cefoxitina (10,5 a 100%), kanamicina (5,2 a 79,3%), penicilina (2,1 a 100%), tetraciclina (10 a 91,2%). Todos os isolados dos 9 trabalhos foram oriundos de frangos (ALI et al., 2017; AWOGBEMI et al., 2018; KRAUSHAAR et al., 2017; MKIZE; ZISHIRI; MUKARATIRWA, 2017) e carne de frangos (ABDALLAH et al., 2015; CHAIRAT et al., 2015; KIM et al., 2018; RUBAN et al., 2017; SALLAM et al., 2015), sendo a cepa ST398 a mais comumente encontrada.

Tabela 5. Resumo dos resultados de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* isolados na avicultura nos últimos 5 anos.

Estudo	Região	Referência	Ano do estudo	Nº de isolados	Perfil de resistência (%)
--------	--------	------------	---------------	----------------	---------------------------

1	África	Chairat et al.	2015	19	CIP (5,2), CLD (0), ERY (21), FOX (10,5), KA (5,2), OXA (10,5), P (94,7), S (0), T (36,8), TOB (0)
2	África	Sallam et al.	2015	288	AK (53,1), AMP (5,9), AMX (8,7), C (52,1), CIP (71,2), ERY (11,1), GM (64,2), NET (70,5), OB (1), P (2,1), RIF (50), S (28,8), SXT (77,1), T (18,8), VAN (87,5)
3	África	Mkize et al.	2017	29	AMP (27,6), C (69), ERY (62,1), FOX (76), GM (55,2), KA (79,3), S (62,1), T (69), TMP (58,6), VAN (14)
4	África	Awogbemi et al.	2018	10	AMC (80), AMP (100), AMX (100), C (70), GM (30), OB (90), P (80), S (50), T (10)
5	América do Norte	Abdalrahman et al.	2015	113	AMP (92), AZI (39,8), C (2,7), CIP (23), CLD (31,9), DOX (38,1), ERY (39,8), FOX (23,9), GM (28,3), KA (32,7), OXA (30,1), P (57,5), RIF (8,8), SXT (16,8), T (47,8), VAN (23)
6	Ásia	Ali et al.	2017	56	ERY (80,4), GM (28,6), NEO (25), P (94,6), T (82,1)
7	Ásia	Ruban et al.	2017	MRSA 80	FOX (67), MET (45), OXA (65)
8	Ásia	Kim et al.	2018	121	AMC (5), AMP (51,2), C (2,5), CAZ (2,5), CFN (1,7), CFX (1,7), CFZ (1,7), CIP (33,9), CLD (19), CTX (1,7), DOX (20,7), ERY (20,7), FEP (1,7), GM (19), KA (24,7), P (51,2), RIF (2,5), SXT (0,8), T (38,8)
9	Europa	Kraushaar et al.	2016	68	C (2,9), CIP (39,7), CLD (88,2), ERY (85,3), FD (2,9), FOX (100), GM (2,9), KA (22,1), P (100), QD (80,9), S (27,9), SUL (1,5), T (91,2), TIA (63,2), TMP (73,5)

AK, ampicilina; AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina; AZI, azitromicina; C, cloranfenicol; CAZ, ceftazidima; CFN, cefalotina; CFX, cefuroxima; CFZ, cefazolina; CIP, ciprofloxacina; CLD, clindamicina; CTX, cefotaxima; DOX, doxiciclina; ERY, eritromicina; FEP, cefepima; FD, fusidato; FOX, cefoxitina; GM, gentamicina; KA, kanamicina; MET, metilicina; NEO, neomicina; NET, netilmicina; OB, cloxacilina; OXA, oxacilina; P, penicilina; QD, quinupristina/ dalfopristina; RIF, rifampicina; S, estreptomicina; SUL, sulfametoxazol; SXT, sulfametoxazol/trimetoprima; T, tetraciclina; TIA, tiamulina; TMP, trimetoprima; TOB, tobramicina; VAN, vancomicina.

3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE IMPORTÂNCIA PARA A AVICULTURA

3.1 Betalactâmicos

β -lactamases são enzimas produzidas por bactérias e que conferem resistência a β -lactâmicos. Este mecanismo é a principal forma de resistência em Gram-negativas (ELIOPOULOS; BUSH, 2001), e está presente em Gram-positivas, embora mutações nas proteínas de ligação às penicilinas (PBPs) sejam mecanismos mais prevalentes nestas bactérias (FISHER; MOBASHERY, 2016).

Os diversos tipos de β -lactamases que conhecemos atualmente foram arranjados em grupos e classes, inicialmente por Ambler, nos anos 80 e mais recentemente, atualizada por Bush e Jacoby na última década (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010). Os β -lactâmicos foram distribuídos em 4 diferentes classes, de acordo com o sítio ativo serino-dependente (classes A, C e D) ou pelo uso de zinco como cofator (classe B) (AMBLER, 1980).

A classe A de Ambler abriga β -lactamases de espectro limitado e sensíveis à inibidores de serino β -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Algumas penicilinasas, e β -lactamases de espectro ampliado (ESACs) e estendido (ESBLs), também sensíveis aos inibidores, fazem parte dessa classe (BUSH; BRASFORD, 2016; BUSH; JACOBY, 2010). Dentre as enzimas pertencentes a esse grupo estão TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (subgrupo 2b); PSE-1 e CARB-3 (subgrupo 2c); TEM-3, SHV-2 e CTX-M-1 (subgrupo 2be); KPC-2, IMI-1 e SME-1 (subgrupo 2f) (BUSH; JACOBY, 2010).

Em isolados de avicultura, genes do subgrupo 2b (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-20}), subgrupo 2c (*bla*_{PSE-1}) e subgrupo 2be (*bla*_{CTX-M-1}) têm sido identificados em diferentes espécies bacterianas ao redor do mundo, incluindo *E. coli* e *Salmonella* spp. (DIERIKX et al., 2010; EGEA et al., 2012; FITCH et al., 2016; GYLES, 2008; HORTON et al., 2011; RASMUSSEN et al., 2015; SANDEGREN et al., 2018).

As cefalosporinasas são o grupo de enzimas pertencentes à classe C dos β -lactâmicos. A produção desta β -lactamase cromossomal envolve genes codificadores (*AmpC*) e genes indutores (*AmpD*, *AmpG* e *AmpR*) (JACOBS; FRÈRE; NORMARK, 1997; LIVERMORE, 1995). O gene *AmpC* sofre desrepressão induzida, produzindo a enzima de resistência de forma reversível (LIVERMORE, 1995). Esta β -lactamase confere resistência às penicilinas e cefalosporinas de terceira geração (BUSH; JACOBY, 2010). Entretanto, quando induzida por carbapenêmicos (imipenem e meropenem), a produção de AmpC é elevada em até 1000x, levando à resistência a,

praticamente, todas cefalosporinas, incluindo as de quarta geração (JACOBY, 2009; NI et al., 2005; RASMUSSEN; BUSH, 1997). Desta forma, espécies produtoras de AmpC podem iniciar o tratamento sensíveis à cefalosporinas de amplo espectro e tornar-se resistentes, no decorrer do tratamento (MOROSINI et al., 1998).

O gene *AmpG* é responsável pela indução e hiperprodução da AmpC cromossomal. Este gene codifica uma proteína transmembrana que carrega ao citoplasma e converte a molécula sinalizadora N-acetilglucosamina (GluNac)-1,6-anhMurNac, necessária à indução da β -lactamase (DIETZ; PFEIFLE; WIEDEMANN, 1996). Os genes *AmpD* e *AmpR* atuam na inibição da AmpC (BAGGE et al., 2002; JACOBS et al., 1995; KUGA; OKAMOTO; INOUE, 2000). A baixa produção de AmpD resulta em hiperprodução da β -lactamase, enquanto AmpR potencializa a expressão de *AmpC* em até 100x (JACOBS; FRÈRE; NORMARK, 1997; JUAN et al., 2005).

Estudos recentes demonstram outros fatores que estão envolvidos com a produção de AmpC. Moyá et al. (2009) demonstraram que mutações no gene *dacB*, que codifica a proteína PBP4, são responsáveis por hiperprodução de AmpC dependente de AmpR.

No fim da década de 90 foram identificados os primeiros isolados contendo plasmídeos carregando *AmpC* mutante capaz de promover espectro ampliado de resistência a β -lactâmicos (ESAC), incluindo cefalosporinas como cefepime (MOROSINI et al., 1998). Estes isolados têm sido descritos em humanos e animais, sugerindo a produção destas enzimas resistentes em diferentes populações de bactéria Gram-negativas (HAENNI; CHÂTRE; MADEC, 2014). Para reduzir o efeito clínico da β -lactamase, ensaios utilizando o avibactam associado a cefalosporinas de terceira geração foram conduzidos. Os resultados demonstraram efeito contra bactérias produtoras de AmpC com espectro estendido, bem como baixo risco de seleção dos genes AmpC-variantes por estas bactérias (PORRES-OSANTE et al., 2014).

A classe D das β -lactamases é composta por oxacilinases disseminadas por plasmídeos, cuja principal enzima é a OXA-48, descrita em *Enterobacteriaceae* causadoras de surtos na Europa (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). Em isolados de frangos e carne de frango, os genes *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58} foram recentemente identificados na Ásia, África e Europa (MORRISON; RUBIN, 2015; SELMA et al., 2018; VITAS et al., 2018).

As oxacilinases são capazes de hidrolisar carbapenêmicos, cefalosporinas e monobactâmicos de espectros ampliado e estendido, e não têm sua atividade suprimida por ação de inibidores, com exceção da enzima OXA-48, embora possa ser inibida por NaCl (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012; STRATEVA; YORDANOV, 2009; WHO, 2017).

Apesar das crescentes descobertas de enzimas OXA-tipos resistentes a carbapenêmicos em diferentes espécies ao redor do mundo, *Acinetobacter baumannii* é a espécie que mais abriga oxacilinases resistente a carbapenêmicos (WHALTER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006). O fato da maioria destas enzimas estarem localizadas no cromossomo resulta na lenta disseminação de enzimas OXAs inter e intra espécies (POIREL; NORDMANN, 2006; WHALTER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Diferentemente dos outros grupos de β -lactamases, a classe B caracteriza-se por usar cátions divalentes como cofator da atividade catalítica (Zn^{2+} , principalmente), ao invés de um resíduo de serina (BUSH; JACOBY, 2010). As metalo- β -lactames (M β la) são capazes de hidrolisar todas as drogas da classe de β -lactâmicos, com exceção do aztreonam (monobactâmico), e não sofrem ação de inibidores de serino- β -lactamases, mas são inibidas por agentes quelantes (EDTA, ácido dipicolínico e ácido mercaptopropiônico) (RASMUSSEN; BUSH, 1997; WALSH et al., 2005).

As M β la estão subdivididas em 3 subgrupos: o primeiro caracterizado por possuir enzimas de amplo espectro, capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e imipenem (subgrupo 3a); o segundo é composto por enzimas chamadas de verdadeiras carbapenemases: hidrolisam preferencialmente carbapenêmicos, necessitam de Zn^{2+} para atividade enzimática e são inibidos por EDTA (subgrupo 3b); por último, o subgrupo 3c, menos frequentemente encontrado em espécies bacterianas, é composto por enzimas que hidrolisam rapidamente a cefaloridina (cefalosporina) e ampicilina (penicilina) (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012; RASMUSSEN; BUSH, 1997).

As enzimas da classe B podem ser intrínsecas ou adquiridas (ou móveis) com maior importância clínica a estas últimas (NORDMANN; POIREL, 2002). Dentre as mais importantes M β las estão a Florence imipenemase metalo- β -lactamase (FIM), German imipenemase metalo- β -lactamase (GIM), imipenemase metalo- β -lactamase (IMP), New Delhi metalo- β -lactamase (NDM), São Paulo metalo- β -lactamase (SPM) e Verona imipenemase metalo- β -lactamase (VIM) (BEBRONE, 2007; CASTANHEIRA

et al., 2004; HONG et al., 2015; LIVERMORE; WOODFORD, 2000; NORDMANN; POIREL, 2002; POIREL et al., 2004). Em isolados provenientes da avicultura, os genes *bla*_{NDM-T} (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{NDM-5}), e *bla*_{VIM-T} (*bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-48}) são os mais comumente encontrados ao redor do mundo (ABDALAAH et al., 2015; MADEC et al., 2017; RANJAN et al., 2016; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2017).

3.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são uma das principais escolhas para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas em aves, incluindo fármacos como amicacina, estreptomicina e gentamicina. Entretanto, isolados resistentes têm sido identificados em amostras de frangos e derivados (DOU et al., 2016).

A resistência a aminoglicosídeos pode ser manifestada por diferentes mecanismos, incluindo produção de enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos (AMEs), presença de bombas de efluxo e permeabilidade reduzida da membrana celular à droga (POOLE, 2007; SHAKIL et al., 2008). Ainda, a resistência pode ocorrer por metilação do sítio de ligação da subunidade 16S do rRNA (DOI; ARAKAWA, 2007), impedindo a ligação do antibiótico com sítio-alvo. Entretanto, o principal mecanismo de ação dessa classe de fármacos é pela inibição da síntese proteica bacteriana, por ligação ao sítio aminoacílico da subunidade 30S dos ribossomos (MAGNET; BLANCHARD, 2005).

As acetiltransferases (AAC), adeniltransferases (ANT) e fosfotransferases (APH) são classes de AMEs, comumente encontradas em elementos móveis, como transposons e plasmídeos (AHMED; SHIMAMOTO, 2004; MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999). Na avicultura, as enzimas mais frequentemente expressas incluem: AAC(3')-II e AAC(6')-II (resistência a gentamicina, netilmicina e tobramicina); AAC(3')-IV (resistência a gentamicina e apramicina); AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia (resistência a amicacina, gentamicina, kanamicina e tobramicina); ANT(2')-I (resistência a gentamicina e tobramicina); ANT(6')-Ia (resistência a estreptomicina); APH(3')-I (resistência a kanamicina, neomicina e paromicina); APH(3')-III (resistência a amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina e paromicina) (HIDANO et al., 2015; KASSEM et al., 2017; POETA et al., 2006; ZHU et al., 2017).

A metilação do gene 16S rRNA confere alta resistência aos aminoglicosídeos, e está presente, na maioria das vezes, em isolados resistentes a múltiplas drogas (DOI; ARAKAWA, 2007). A enzima metiltransferase ribossomal (Rmt) é geralmente codificada por genes presentes em elementos genéticos móveis. Dentre estes, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* e *rmtE* têm sido descritos como genes codificadores da rRNA metilase (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016; WACHINO; ARAKAWA, 2012). Em frangos de corte, isolados multirresistentes de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella* spp. foram identificados como produtores de ArmA, RmtB, RmtC e RmtD (WANG et al., 2017; YANG et al., 2015).

Dificuldade de ligação à membrana e/ou redução da absorção dos aminoglicosídeos pela membrana bacteriana, provocada por mutações pontuais, também configura importante mecanismo de resistência a essa classe de drogas (EL'GARCH et al., 2007). Nesse contexto, membros da família de divisão da nodulação de resistência (RND) regulam a atividade de bombas de efluxo, como o sistema MexXY-OprM (POOLE, 2007), conferindo impermeabilidade a aminoglicosídeos, por mutação e inativação dos genes *mexZ* e *rplY* (POONSUK; TRIBUDDHARAT; CHUANCHUEN, 2012; SMITH et al., 2006). Ainda, mutações no gene *galU* e a não expressão do gene *nuoG* conferem, respectivamente, resistência a aminoglicosídeos por alterações em lipopolissacarídeos de membrana e diminuição da absorção da droga pela bactéria (EL'GARCH et al., 2007).

3.3 Fluoroquinolonas

Drogas da classe das fluoroquinolonas são antimicrobianos de amplo espectro que atuam inibindo a replicação do DNA bacteriano (HOOPER, 1999). O mecanismo de resistência a essas drogas resulta, principalmente, de mutações cromossômicas gerando alterações na DNA-girase e/ou na topoisomerase IV, ou mutações que alterem a expressão de bombas de efluxo (BLAIR et al., 2015).

Em regiões cromossômicas de bactérias, chamadas de regiões determinantes de resistência a quinolonas (QRDRs), ocorrem mutações, principalmente em *gyrA* e *parC*, conferindo elevados níveis de resistência (HAWKEY, 2003). As principais substituições encontradas em *gyrA* são Thr-86-Ile (*Campylobacter* spp.), Ser-83-Leu e

Asp-87-Asn (*E. coli*), Ser-83-Leu, Asp-87-Asn/Gly e His-211-Tyr (*Shigella* spp.) e Ser-80-Tyr (*S. aureus*); no gene *parC*, as principais substituições são Ser-80-Ile (*Shigella* spp.) e Ser-85-Leu (*Vibrio cholerae*) (AZMI et al., 2014; BLANCHE et al., 1996; KARIUKI et al., 2007; KINANA et al., 2006; QUILICI et al., 2010). Mais recentemente, mutações nos genes *gyrB* e *parE*, que causam elevados níveis de resistência a quinolonas têm sido relatadas em *E. coli* e *C. freundii* (SEKYERE; AMOAKO, 2017).

A resistência às quinolonas e fluoroquinolonas é potencialmente elevada com o acúmulo de mutações em ambas as enzimas alvo. Espécies de bactérias com altos níveis de resistência a esta classe de antimicrobianos, principalmente as *Enterobacteriaceae*, apresentam mutações tanto na DNA-girase, quanto na topoisomerase IV (BLAIR et al., 2015; HOOPER; JACOBY, 2016).

Dentre os mecanismos de resistência mediados por plasmídeos, os genes de resistência à quinolonas (*qnr*-tipos) são os mais frequentemente encontrados. As proteínas Qnr ligam-se à DNA-girase ou à topoisomerase IV, impedindo a ligação das quinolonas e, consequentemente, a ação antimicrobiana (RUIZ; PONS; GOMES, 2012; VIEN et al., 2012). Estes genes foram descritos pela primeira vez em 1998, em isolados de *Enterobacteriaceae*, com a descoberta do gene *qnrA1* (MARTINEZ-MARTINEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998). Desde então, diversas variantes dos *qnr* têm sido reportados: 8 de *qnrA* (*qnrA1* – *qnrA8*); 94 de *qnrB* (*qnrB1* – *qnrB94*); 1 de *qnrC*; 3 de *qnrD* (*qnrD1* – *qnrD3*); 1 de *qnrE*; 9 de *qnrS* (*qnrS1* – *qnrS9*); 10 de *qnrVC* (*qnrVC1* – *qnrVC10*) (<http://www.lahey.org/qnrstudies/> - acesso 08nov. 2018).

Outro mecanismo de resistência é mediado por uma aminoglicosídeo-N-acetiltransferase (*aac(6')-Ib-cr*), que gera uma atividade reduzida por acetilação de fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (CHATTAWAY et al., 2016; RUIZ; PONS; GOMES, 2012). Bombas de efluxo codificadas pelos genes plasmidiais *qepA* e *oqxAB* são um dos mais predominantes meios responsáveis por resistência seletivas às fluoroquinolonas (HANSEN et al., 2007; YAMANE et al., 2007). Entretanto, este sistema de efluxo não parece ser o principal mecanismo de resistência a fluoroquinolonas, em *E. coli* e *Campylobacter* spp. (SEKYERE; AMOAKO, 2017).

Em frangos de corte e poedeiras, isolados de *E. coli* e *Campylobacter* spp. resistentes a fluoroquinolonas têm sido relacionados à mutação missense nos genes

gyrA (Ser-83-Leu e Thr-86-Ile) e *parC* (Ser-58-Arg ou Ser-58-Ile) (FRASAO et al., 2015; PAYOT et al., 2004; YUE et al., 2008). Por outro lado, genes mediados por plasmídeos *qnr-tipos* e *aac(6')-lb-cr* estão relacionados a baixos níveis de resistência, quando individualizados, ou a elevados níveis de resistência, quando mais de um mecanismo está presente (ARMAS-FREIRE et al., 2015; LI et al., 2014; YUE et al., 2008).

3.4 Tetraciclínas

As drogas da classe das tetraciclínas agem por inibição da síntese proteica bacteriana. Ligam-se à subunidade 30S do rRNA, consequentemente impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo e adição de aminoácidos a cadeia peptídica (SHLAES, 2006). Assim, os mecanismos de resistência às tetraciclínas ocorrem por diminuir/impedir o acesso da droga aos ribossomos.

O mecanismo mais comum de resistência é o sistema de bombas de efluxo, que está presente tanto em Gram-negativas, quanto em Gram-positivas (MCMURRY; PETRUCCI; LEVY, 1980; THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2010). Este mecanismo é composto por genes que podem ser cromossomais ou plasmidiais, subdivididos em mais de 20 classes: *tet(J)*, *tet(V)*, *tet(30)*, *tet(35)*, *tet(38)*, *tet(41)*, *tet(42)*, *otrB*, *otrC*, *tcr3*, (genes cromossomais), *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(P)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(31)*, *tet(33)*, *tet(39)*, e *tet(40)* (genes plasmidiais) (SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992; THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2010). O mecanismo de efluxo confere à bactéria uma forma de expulsar a droga do meio intracelular, diminuindo a concentração do antibiótico interior da célula (NG et al., 2001; ROBERTS, 1996; SCHNAPPINGER; HILLEN, 1996). O sistema de efluxo é codificado por genes pertencentes a superfamília de proteínas facilitadoras (MSF), que funcionam seletivamente, tendo como substrato as tetraciclínas (THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2010; ZECHINI; VERSACE, 2009).

Alguns genes do grupo *tet* codificam proteínas do sistema de efluxo, outros codificam proteínas protetoras do ribossomo, dentre as quais *tet(M)*, *tet(W)*, *tet(O)*, *tet(Q)* e *tet(44)* são exemplos (CONNELL et al., 2003; LINKEVICIUS; SANDEGREN;

ANDERSSON, 2015; ROBERTS, 1996). As proteínas codificadas por esses genes interagem com a h34, presente na subunidade 30S do rRNA. Esta ligação desfaz a ligação entre antibiótico e ribossomo, que volta a sua conformação normal e pode prosseguir com a síntese proteica (ARENZ et al., 2015; CONNELL et al., 2003; SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992). Este mecanismo confere resistência à primeira e à segunda gerações de tetraciclina, porém não confere resistência à tigeciclina (LINKEVICIUS; SANDEGREN; ANDERSSON, 2015; THAKER; SPANOGIANNOPOULOS; WRIGHT, 2010).

A inativação enzimática, dentre os mecanismos de resistência às tetraciclina, é o menos prevalente e estudado. Entretanto, este mecanismo é o único capaz de inativar as três gerações das tetraciclina, incluindo a tigeciclina, hidrolisada pela proteína Tet(X) (ROBERTS, 2005; VOLKERS et al., 2011). Apesar do *tet(X)* ser o único gene com ação de inativação enzimática comprovada, outros como *tet(34)* e *tet(37)* estão relacionados à hidrólise das tetraciclina (LINKEVICIUS; SANDEGREN; ANDERSSON, 2015; VOLKERS et al., 2011).

Em isolados provenientes da avicultura, os genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(D)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)* têm sido frequentemente estudados, com altas frequências encontradas para *tet(K)* em *S. aureus*; *tet(M)* em *Enterococcus* spp.; *tet(A)* em *Campylobacter* spp. e *E. coli*; *tet(O)* em *Campylobacter* spp. (AARESTRUP et al., 2000; ABDI-HACHESOO et al., 2014; AGERSØ; PEDERSEN; AARESTRUP, 2006; AYENI et al., 2016; GUERRA et al., 2003; WANG et al., 2017b).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na avicultura, uma vasta gama de espécies e cepas bacterianas pode acometer frangos e poedeiras, causando ou não doenças aos animais. Esses isolados demonstram elevados níveis de resistência a várias drogas diferentes, incluindo drogas avançadas, consideradas de última escolha nos tratamentos de doenças graves, como cefalosporinas de terceira e quarta geração e fluoroquinolonas.

As bactérias resistentes podem ser transmitidas não só pelo contato direto com os animais, mas também veiculadas por seus produtos como carne e ovos, carreando consigo os genes que codificam resistência, sejam eles naturais ou adquiridos. O uso inadequado de antimicrobianos pode contribuir para a aquisição de resistência a uma ou mais classe de drogas, carregados em um ou mais genes.

Países da Europa seguem a tendência, iniciada pelo Reino Unido, de diminuição do uso de antimicrobianos de forma profilática ou como promotores de crescimento na avicultura. Na contramão dessa tendência, países em desenvolvimento, como Brasil e China, permanecem utilizando desse artifício com finalidade de ganho produtivo. Essa dualidade é tema de debate e preocupação dos pesquisadores e autoridades mundiais por mais de 2 décadas.

Apesar de ainda em discussão, a retirada de antimicrobianos da produção animal, em especial avicultura, parece tomar um caminho sem volta na atual conjuntura. Entretanto, essa medida não pode significar a exclusão destas drogas da produção; se o uso indiscriminado favorece o surgimento de isolados resistentes, os antibióticos são necessários ao bem-estar animal em casos de infecções graves.

Devido à potencialidade de enfrentamentos a falta de novas drogas que sejam capazes de superar os mecanismos desenvolvidos pelas bactérias à resistência, o uso consciente e racional destas drogas parece ser a forma mais adequada de garantir a eficácia dos antimicrobianos já existentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M. et al. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 353–364, jun. 2000.
- ABDALLAH, H. M. et al. Extended-spectrum β -lactamases and/or carbapenemases-producing enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Zagazig, Egypt. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136052, ago. 2015.
- ABDI-HACHESOO, B. et al. Tetracycline resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *c. coli* isolated from poultry carcasses. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 9, set. 2014.
- AGADA, G. O. A. et al. Prevalence and antibiotic resistance profile of *Salmonella* isolates from commercial poultry and poultry farm-handlers in Jos, Plateau State, Nigeria. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 4, p. 462–479, abr. 2014.
- AGERSØ, Y.; PEDERSEN, A. G.; AARESTRUP, F. M. Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(m)* in enterococci from humans, pigs and poultry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 832–839, mai. 2006.
- AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. A plasmid-encoded class 1 integron carrying sat, a putative phosphoserine phosphatase gene and AadA2 from enterotoxigenic *Escherichia coli* O159 isolated in Japan. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235, n. 2, p. 243–248, jun. 2004.
- ALI, Y. et al. Characterization, prevalence and antibiogram study of *Staphylococcus aureus* in poultry. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 3, p. 253–256, mar. 2017.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, maio 1980.
- AMIR, M. et al. Impact of unhygienic conditions during slaughtering and processing on spread of antibiotic resistant *Escherichia coli* from poultry. **Microbiology Research**, v. 8, n. 2, nov. 2017.
1. ANTUNES, P. et al. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110–121, fev. 2016.
- ARENZ, S. et al. Cryo-EM structure of the tetracycline resistance protein TetM in complex with a translating ribosome at 3.9-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201501775, abr. 2015.

ARMAS-FREIRE, P. I. et al. Unexpected distribution of the fluoroquinolone-resistance gene *qnrB* in *Escherichia coli* isolates from different human and poultry origins in Ecuador **International Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 85–90, jun. 2015.

AWOGBEMI, J.; MOSES, A.; EZEKIEL OLUGBENGA, A. A survey of antimicrobial agents usage in poultry farms and antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Staphylococci* isolates from the poultry in Ile-Ife, Nigeria. **Journal of Infectious Diseases and Epidemiology**, v. 4, n. 1, mar. 2018.

AYENI, F. A. et al. Identification and prevalence of tetracycline resistance in enterococci isolated from poultry in Ilishan, Ogun State, Nigeria. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 8, n. 1, p. 69–73, jan. 2016.

AZMI, I. J. et al. Fluoroquinolone resistance mechanisms of *Shigella flexneri* isolated in Bangladesh. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102533, jul. 2014.

BAE, D.; CHENG, C.-M.; KHAN, A. A. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing non-typhoidal *Salmonella* (NTS) from imported food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 12–17, dez. 2015.

BAGGE, N. et al. Constitutive high expression of chromosomal β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in AmpD. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3406–3411, jan. 2002.

BARBIERI, N. L. et al. Mcr-1 identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0172997, mar. 2017.

BARON, S. et al. Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5428–5434, jan. 2014.

BEBRONE, C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 12, p. 1686–1701, dez. 2007.

BLAAK, H. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (esbl)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, n. 1, p. 239–246, jan. 2014.

BLAAK, H. et al. Distribution, numbers, and diversity of esbl-producing *E. coli* in the poultry farm environment. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135402, ago. 2015.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, jan. 2015.

BLANCHE, F. et al. Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II dna topoisomerases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 12, p. 2714–2720, jan. 1996.

BORTOLAIA, V.; ESPINOSA-GONGORA, C.; GUARDABASSI, L. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 130–140, fev. 2016.

BORTOLAIA, V. et al. Persistence of vancomycin resistance in multiple clones of *Enterococcus faecium* isolated from Danish broilers 15 years after the ban of avoparcin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.05072-14, fev. 2015.

BOULIANNE, M. et al. Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 1, p. 49–59, jan. 2016.

BRAGA, J. F. V. et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance profile of *Enterococcus faecalis* isolated from broilers with vertebral osteomyelitis in Southeast Brazil. **Avian Pathology**, v. 47, n. 1, p. 14–22, ago. 2017.

BROWER, C. H. et al. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in poultry chickens and variation according to farming practices in Punjab, India. **Environmental Health Perspectives**, v. 125, n. 7, jul. 2017.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. a025247, jun. 2016.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, jan. 2010.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *blaGIM-1*, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4654–4661, jan. 2004.

CAVACO, L. M. et al. Detection of linezolid resistance due to the *optra* gene in *Enterococcus faecalis* from poultry meat from the American continent (Colombia). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 3, p. 678–683, mar. 2017.

CHAIRAT, S. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* from raw meat samples in Tunisia: detection of clonal lineage ST398 from the African continent. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 8, p. 686–692, jun. 2015.

CHATTAWAY, M. A. et al. Fluoroquinolone-resistant enteric bacteria in Sub-Saharan Africa: clones, implications and research needs. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, abr. 2016.

CHISHIMBA, K. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in market-ready chickens in Zambia. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, p 1-5, mar. 2016.

CONNELL, S. R. et al. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3675–3681, jan. 2003.

CUNHA-NETO, A. da et al. Salmonella isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. **Poultry Science**, v. 97, n. 4, p. 1373–1381, abr. 2018.

DAME-KOREVAAR, A. et al. Dynamics of CMY-2 producing *E. coli* in a broiler parent flock. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 211–214, mai. 2017.

DHANANI, A. S. et al. Genomic comparison of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky isolates from broiler chickens. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128773, jun. 2015.

DIERIKX, C. et al. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 273–278, out. 2010.

DIETZ, H.; PFEIFLE, D.; WIEDEMANN, B. Location of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamylmesodiaminopimelic acid, presumed signal molecule for beta-lactamase induction, in the bacterial cell. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2173–2177, jan. 1996.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal rna methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 88–94, jul. 2007.

DOI, Y.; WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16s ribosomal rna methyltransferases. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 2, p. 523–537, jun. 2016.

DOLKA, B. et al. Characterization of pathogenic *Enterococcus cecorum* from different poultry groups: broiler chickens, layers, turkeys, and waterfowl. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185199, set. 2017.

DONADO- GODOY, P. et al. The establishment of the colombian integrated program for antimicrobial resistance surveillance (COIPARS): a pilot project on poultry farms, slaughterhouses and retail market. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. s1, p. 58–69, jun. 2014.

DOU, X. et al. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated in eastern China. **Gene**, v. 576, n. 1, Part 2, p. 244–248, jan. 2016.

EFSA. The european union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. **EFSA Journal**, v. 14, n. 2, p. 4380, fev. 2016.

EGEA, P. et al. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 69–73, out. 2012.

EL'GARCH, F. et al. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 1016–1021, jan. 2007.

ELIOPOULOS, G. M.; BUSH, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 1085–1089, abr. 2001.

EL-TRAS, W. F. et al. *Campylobacter* infections in children exposed to infected backyard poultry in Egypt. **Epidemiology & Infection**, v. 143, n. 2, p. 308–315, jan. 2015.

FERREIRA, J. C. et al. Identification and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* isolated from healthy poultry in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 60, p. 66–70, 1 jun. 2018.

FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. β -lactam resistance mechanisms: gram-positive bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. a025221, abr. 2016.

FITCH, F. M. et al. β -lactam resistance genes: characterization, epidemiology, and first detection of *bla*CTX-M-1 and *bla*CTX-M-14 in *Salmonella* spp. isolated from poultry in Brazil—Brazil Ministry of Agriculture's pathogen reduction program. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 2, p. 164–171, set. 2016.

FAO. **FO_Meat_June_2016.pdf**. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Meat/Documents/FO_Meat_June_2016.pdf. Acesso em: 24 jul. 2018.

FRASAO, B. da S. et al. Detection of fluoroquinolone resistance by mutation in GyrA gene of *Campylobacter* Spp. isolates from broiler and laying (*Gallus Gallus Domesticus*) hens, from Rio de Janeiro state, Brazil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 2013–2018, nov. 2015.

GARCIA-MIGURA, L. et al. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1, p. 1–9, maio 2014.

GARCÍA-SÁNCHEZ, L. et al. Characterization of *Campylobacter* species in Spanish retail from different fresh chicken products and their antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v. 76, p. 457–465, dez. 2018.

GIBBONS, J. F. et al. Antimicrobial resistance of faecal *Escherichia coli* isolates from pig farms with different durations of in-feed antimicrobial use. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 3, p. 241–250, maio 2016.

GOULD, I. M. The epidemiology of antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 2–9, nov. 2008.

GRANT, A.; HASHEM, F.; PARVEEN, S. *Salmonella* and *Campylobacter*: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. **Food Microbiology**, v. 53, p. 104–109, fev. 2016.

GUABIRABA, R.; SCHOULER, C. Avian Colibacillosis: Still Many Black Holes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 15, 1 ago. 2015.

GUERRA, B. et al. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 489–492, set. 2003.

GYLES, C. L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 149–158, dez. 2008.

HAENNI, M.; CHÂTRE, P.; MADEC, J.-Y. Emergence of *Escherichia coli* producing extended-spectrum AmpC β -lactamases (ESAC) in animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, fev. 2014.

HAN, X. et al. Prevalence, antimicrobial resistance profiling and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broilers at slaughter in China. **Food Control**, v. 69, p. 160–170, nov. 2016.

HANSEN, L. H. et al. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 145–147, jul. 2007.

HASMAN, H. et al. Detection of Mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 49, dez. 2015.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 90001, p. 29–35, maio 2003.

HIDANO, A. et al. Unraveling antimicrobial resistance genes and phenotype patterns among *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken products in Japan. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121189, mar. 2015.

HOFFMANN, S.; BATZ, M. B.; MORRIS, J. G. Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 7, p. 1292–1302, jul. 2012.

HONG, D. J. et al. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection & Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 81–97, jun. 2015.

HOOPER, D. C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 2, n. 1, p. 38–55, fev. 1999.

- HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 9, p. a025320, jan. 2016.
- HORTON, R. A. et al. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3715–3719, jan. 2011.
- HUSSAIN, A. et al. Risk of transmission of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from commercial broiler and free-range retail chicken in India. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, nov. 2017.
- JACOBS, C. et al. AmpD, essential for both β -lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 553–559, fev. 1995.
- JACOBS, C.; FRÈRE, J.-M.; NORMARK, S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in gram-negative bacteria. **Cell**, v. 88, n. 6, p. 823–832, mar. 1997.
- JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, jan. 2009.
- JAMROZY, D. M. et al. Comparative genotypic and phenotypic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from animals and humans. **PLOS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40458, jul. 2012.
- JOHNSON, J. R. et al. Extraintestinal pathogenic and antimicrobial resistant *Escherichia coli*, including sequence type 131 (ST131), from retail chicken breasts: United States, 2013. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM.02956-16, jan. 2017.
- JUAN, C. et al. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by ampc hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4733–4738, jan. 2005.
- KAAKOUSH, N. O. et al. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 687–720, jan. 2015.
- KARIKARI, A. B. et al. Multidrug resistant campylobacter in faecal and carcasses of commercially produced poultry. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 7, p. 271–277, fev. 2017.
- KARIUKI, S. et al. *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections resistant to fluoroquinolones and extended-spectrum beta-lactams. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 1, n. 03, p. 257–262, dez. 2007.

KASSEM, I. I. et al. Antimicrobial-resistant *Campylobacter* in organically and conventionally raised layer chickens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 1, p. 29–34, jan. 2017.

KATAKWEBA, A. A. S. et al. First report on a randomized investigation of antimicrobial resistance in fecal indicator bacteria from livestock, poultry, and humans in Tanzania. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 3, p. 260–268, jul. 2017.

KHAN, H. A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 509–514, jul. 2015.

KHEIRI, R.; AKHTARI, L. Antimicrobial resistance and integron gene cassette arrays in commensal *Escherichia coli* from human and animal sources in IRI. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 40, ago. 2016.

KILONZO-NTHENGE, A. et al. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from organic and conventional retail chicken. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 4, p. 760–766, abr. 2015.

KIM, Y. B. et al. Characteristics of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat produced by different integrated broiler operations in Korea. **Poultry Science**, v. 97, n. 3, p. 962–969, mar. 2018.

KINANA, A. D. et al. Genetic diversity and quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry in Senegal. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3309–3313, jan. 2006.

KOGA, V. L. et al. Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 6, p. 479–485, maio 2015.

KOTTAWATTA, K. S. A. et al. *Campylobacter* in broiler chicken and broiler meat in sri lanka: influence of semi-automated vs. wet market processing on *Campylobacter* contamination of broiler neck skin samples. **Foods**, v. 6, n. 12, p. 105, nov. 2017.

KRAUSHAAR, B. et al. Antimicrobial resistances and virulence markers in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from broiler and turkey: A molecular view from farm to fork. **Veterinary Microbiology**, v. 200, p. 25–32, fev. 2017.

KUGA, A.; OKAMOTO, R.; INOUE, M. AmpR Gene Mutations That Greatly Increase Class C β -Lactamase Activity in *Enterobacter Cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 561–567, 3 jan. 2000.

LAMBRECHT, E. et al. Characterization of cefotaxime- and ciprofloxacin-resistant commensal *Escherichia coli* originating from Belgian farm animals indicates high antibiotic resistance transfer rates. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 707–717, jan. 2018.

- LANDERS, T. F. et al. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4–22, jan. 2012.
- LANDONI, M. F.; ALBARELLOS, G. The use of antimicrobial agents in broiler chickens. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 21–27, jul. 2015.
- LI, L. et al. Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from chickens in Anhui province, China. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104356, ago. 2014.
- LINKEVICIUS, M.; SANDEGREN, L.; ANDERSSON, D. I. Potential of tetracycline resistance proteins to evolve tigecycline resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.02465-15, 23 nov. 2015.
- LIVERMORE, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–584, jan. 1995.
- LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 489–495, out. 2000.
- LJUBOJEVIĆ, D. et al. Epidemiological significance of poultry litter for spreading the antibiotic-resistant strains of *Escherichia coli*. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, n. 3, p. 485–494, set. 2016.
- MAAMAR, E. et al. High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from poultry in Tunisia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 231, p. 69–75, ago. 2016.
- MAASJOST, J. et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from poultry flocks in Germany. **Avian Diseases**, v. 59, n. 1, p. 143–148, jan. 2015.
- MADEC, J. Y. et al. Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 11, p. 826–833, nov. 2017.
- MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 477–498, fev. 2005.
- MAJOWICZ, S. E. et al. Global incidence of human shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 6, p. 447–455, abr. 2014.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **The Lancet**, v. 351, n. 9105, p. 797–799, mar. 1998.
- MCMURRY, L.; PETRUCCI, R. E.; LEVY, S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 7, p. 3974–3977, jul. 1980.

MENDONÇA, N. et al. Microarray evaluation of antimicrobial resistance and virulence of *Escherichia coli* isolates from portuguese poultry. **Antibiotics**, v. 5, n. 1, p. 4, jan. 2016.

MINGEOT-LECLERCQ, M.-P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 727–737, 4 jan. 1999.

MKIZE, N.; ZISHIRI, O. T.; MUKARATIRWA, S. Genetic characterisation of antimicrobial resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from commercial broiler chickens in the Durban metropolitan area, South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 88, n. 1, p. 1–7, mai. 2017.

MONTE, D. F. M. do et al. Chicken meat as reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* carrying mcr-1 genes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.02718-16, fev. 2017.

MOROSINI, M.-I. et al. An extended-spectrum AmpC-type β -lactamase obtained by in vitro antibiotic selection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 165, n. 1, p. 85–90, ago. 1998.

MORRISON, B. J.; RUBIN, J. E. Carbapenemase producing bacteria in the food supply escaping detection. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126717, maio 2015.

MOYA, B. et al. β -Lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 3, p. e1000353, mar. 2009.

NG, L.-K. et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 4, p. 209–215, ago. 2001.

NGBEDE, E. O. et al. Antimicrobial resistance and virulence profile of enterococci isolated from poultry and cattle sources in Nigeria. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 3, p. 451–458, mar. 2017.

NGUYEN, V. T. et al. Prevalence and risk factors for carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* on household and small-scale chicken farms in the mekong delta of vietnam. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 2144–2152, jul. 2015.

NGUYEN, D. P. et al. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase- and ampc β -lactamase-producing *Escherichia coli* within the food distribution system of Ho Chi Minh City, Vietnam. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-9, jan. 2016.

NHUNG, N. T. et al. Antimicrobial usage and antimicrobial resistance in animal production in southeast Asia: a review. **Antibiotics**, v. 5, n. 4, p. 37, nov. 2016.

NHUNG, N. T. et al. Antimicrobial residues and resistance against critically important antimicrobials in non-typhoidal *Salmonella* from meat sold at wet markets and

supermarkets in Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 301–309, fev. 2018.

NI, M.; ZHANG, D.; QI, J. Analysis of AmpC beta-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 17–26, jan. 2005.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 6, p. 321–331, jun. 2002.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 263–272, maio 2012.

NWORIE, A. et al. A novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* T11469 and a poultry endemic strain T002 (ST5) are present in chicken in Ebonyi state, Nigeria. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–5, nov. 2017.

OLSEN, R. H. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. **Avian Pathology**, v. 43, n. 3, p. 199–208, maio 2014.

OSMAN, K. M. et al. Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-resistant *Escherichia coli*: a risk to public health and food safety. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5859, 11 abr. 2018.

PAGE, S. W.; GAUTIER, P. Use of antimicrobial agents in livestock. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 31, n. 1, p. 145–188, abr. 2012.

PANZENHAGEN, P. H. N. et al. Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Control**, v. 61, p. 243–247, mar. 2016.

PASQUALI, F. et al. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates of animal and environmental origins from an integrated poultry production chain. **Veterinary Microbiology**, v. 178, n. 3, p. 230–237, ago. 2015.

PAYOT, S. et al. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 5, p. 468–472, maio 2004.

PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 602–615, jan. 2014.

POETA, P. et al. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 2, p. 131–137, fev. 2006.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 826–836, set. 2006.

POIREL, Laurent et al. molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*SPM-1-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1406–1409, jan. 2004.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of Medicine**, v. 39, n. 3, p. 162–176, jan. 2007.

POONSUK, K.; TRIBUDDHARAT, C.; CHUANCHUEN, R. Aminoglycoside resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from non-cystic fibrosis patients in Thailand. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 51–56, nov. 2012.

PORRES-OSANTE, N. et al. Avibactam activity against extended-spectrum AmpC β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 6, p. 1715–1716, jun. 2014.

QUILICI, M. L. et al. *Vibrio cholerae* O1 variant with reduced susceptibility to ciprofloxacin, western Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1804–1805, nov. 2010.

RANJAN, A. et al. Molecular epidemiology and genome dynamics of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM) producing extraintestinal pathogenic *E. coli* (EXPEC) strains from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.01345-16, set. 2016.

RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 2, p. 223–232, fev. 1997.

RASMUSSEN, M. M. et al. Beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in imported and locally produced chicken meat from Ghana. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139706, out. 2015.

ROBERTS, M. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 1–24, out. 1996.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, n. 2, p. 195–203, abr. 2005.

RUBAN, S. W. et al. Prevalence of panton valentine leukocidin (PVL) gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from market samples of chicken meat. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 2459-2466, abr. 2017.

RUIZ, J.; PONS, M. J.; GOMES, C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 3, p. 196–203, set. 2012.

SAHIN, O. et al. Campylobacter in poultry: ecology and potential interventions. **Avian Diseases**, v. 59, n. 2, p. 185–200, abr. 2015.

SALLAM, K. I. et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail chicken. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 10, p. 1879–1884, out. 2015.

SANDEGREN, L. et al. Long-term carriage and rapid transmission of extended spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* within a flock of mallards in the absence of antibiotic selection. **Environmental Microbiology Reports**, v. 0, n. ja, jul. 2018.

SCHARFF, R. L. et al. An economic evaluation of pulsenet: a network for foodborne disease surveillance. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 50, n. 5, p. 66–73, mai. 2016.

SARAIVA, M. M. S. et al. Off-label use of ceftiofur in one-day chicks triggers a short-term increase of ESBL-producing *E. coli* in the gut. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0203158, set. 2018.

SCHNAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of Microbiology**, v. 165, n. 6, p. 359–369, jun. 1996.

SEKYERE, J. O.; AMOAKO, D. G. Genomic and phenotypic characterisation of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* in Durban, South Africa. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0178888, jun. 2017.

SELMA, C. et al. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-encoding genes in poultry faeces from Algeria and Marseille, France. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 28–32, jun. 2018.

SHAKIL, S. et al. Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. **Journal of Biomedical Science**, v. 15, n. 1, p. 5–14, jan. 2008.

SHLAES, D. M. An Update on Tetracyclines. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 7, n. 2, p. 167–171, fev. 2006.

SILVA, J. et al. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, set. 2011.

SIMONEIT, C. et al. Oral administration of antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E. coli* from chicken – A systematic review. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, n. 1, p. 1–7, jan. 2015.

SMITH, E. E. et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 22, p. 8487–8492, maio 2006.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial Resistance to Tetracycline: Mechanisms, Transfer, and Clinical Significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 387–399, 10 jan. 1992.

STĘPIEŃ-PYŚNIAK, D. et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* strains isolated from poultry. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 64, n. 2, p. 148–163, jun. 2016.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133–1148, set. 2009.

SUNG, H.-W. et al. Patterns of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from fresh and recycled poultry litter. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 3, p. 189–195, jan. 2017.

THAKER, M.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; WRIGHT, G. D. The Tetracycline Resistome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 419–431, fev. 2010.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, jul. 2015.

TORRES, C. et al. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, jul. 2018.

TYSON, G. H. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail meats in the United States, 2002 to 2014. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 1, p. e01902-17, jan. 2018.

USDA. **livestock_poultry.pdf**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2018.

USUI, M. et al. Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in southeast asian countries (Vietnam, Indonesia and Thailand). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 5, p. 685–692, jan. 2014.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, mai. 2015.

VERKADE, E.; KLUYTMANS, J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: animal reservoirs and human infections. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 523–530, jan. 2014.

VIEN, L. T. M. et al. The co-selection of fluoroquinolone resistance genes in the gut flora of vietnamese children. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42919, ago. 2012.

VINUEZA-BURGOS, C. et al. Prevalence and diversity of *Salmonella* serotypes in ecuadorian broilers at slaughter age. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0159567, jul. 2016.

VINUEZA-BURGOS, C. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in ecuadorian broilers at slaughter age. **Poultry Science**, v. 96, n. 7, p. 2366–2374, jul. 2017.

VITAS, A. I. et al. Increased exposure to extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* through the consumption of chicken and sushi products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 269, p. 80–86, mar. 2018.

VOLKERS, G. et al. Structural Basis for a New Tetracycline Resistance Mechanism Relying on the TetX Monooxygenase. **FEBS Letters**, v. 585, n. 7, p. 1061–1066, abr. 2011.

WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 3, p. 133–148, jun. 2012.

WALSH, T. R. et al. Metallo- β -actamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306–325, jan. 2005.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373–383, mar. 2006.

WANG, M. et al. Fate of antimicrobial resistance genes in response to application of poultry and swine manure in simulated manure-soil microcosms and manure-pond microcosms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 26, p. 20949–20958, set. 2017.

WANG, Y. et al. Identification of New Delhi Metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37152, maio 2012.

WANG, Yongxiang et al. Emergence of *Salmonella enterica* serovar Indiana and California isolates with concurrent resistance to cefotaxime, amikacin and ciprofloxacin from chickens in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 262, p. 23–30, dez. 2017.

WEBSTER, P. The perils of poultry. **Canadian Medical Association Journal**, v. 181, n. 1–2, p. 21–24, jul. 2009.

WHO. **Salmonella (Non-Typhoidal)**. Disponível em: <[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))>. Acesso em: 11 jul. 2018.

WHO. Advisory group on integrated surveillance of antimicrobial resistance; world health organization. **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**. [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255027/1/9789241512220-eng.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2018.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. A five-year study on prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* from poultry carcasses in Poland. **Food Microbiology**, v. 49, p. 161–165, ago. 2015.

YAMANE, K. et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3354–3360, jan. 2007.

YANG, Y. et al. Characteristics of plasmids coharboring 16S rRNA methylases, CTX-M, and virulence factors in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from chickens in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 11, p. 873–880, set. 2015.

YUE, L. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 414–420, dez. 2008.

ZECHINI, B.; VERSACE, I. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 4, p. 37-50, jan. 2009.

ZHANG, R. et al. Presence of VIM-positive *Pseudomonas* species in chickens and their surrounding environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00167-17, jan. 2017.

ZHU, Y. et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, p. 43–51, out. 2017.

CAPÍTULO II

O uso sem prescrição de ceftiofur em pintos de um dia desencadeia o aumento, nas duas primeiras semanas pós-eclosão, da produção de ESBL por *E. coli* no intestino

O uso sem prescrição de ceftiofur em pintos de um dia desencadeia o aumento, nas duas primeiras semanas pós-eclosão, da produção de ESBL por *E. coli* no intestino

RESUMO

Este ensaio foi realizado para avaliar o uso sem prescrição de ceftiofur em pintainhos de um dia de idade, simulando uma medida profilática de utilização do fármaco juntamente com a vacina de Marek, que tem sido utilizada em alguns incubatórios comerciais, no surgimento de *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL-*E. coli*). Um total de 168 pintainhos (Cobb500®) foram utilizados em um delineamento inteiramente casualizado. As aves foram divididas em dois tratamentos (solução salina x administração de ceftiofur) e seis repetições, com 14 animais cada. Os esfregaços cloacais foram coletados entre os dias 1 e 14, após eclosão. A maioria dos isolados (86%; $p < 0,001$) produtores de ESBL que continham os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} originaram-se de animais que receberam o antimicrobiano. Nenhum dos isolados foi positivo para os genes AmpC mediados por plasmídeos (*bla*_{ACC}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX} and *bla*_{MIR}) utilizados nesse estudo. Nossos achados indicam que o uso

off-label do ceftiofur juntamente com a vacina de Marek está associado ao aumento, em curto prazo, de ESBL-*E. coli* no intestino de pintainhos.

Palavras-chave: avicultura; *bla*_{CTX-M}; *bla*_{SHV}; β -lactamase de espectro estendido; terceira geração de cefalosporinas.

Off-label use of ceftiofur in one-day chicks triggers increase in the two first weeks post hatching of ESBL-producing *E. coli* in the gut

ABSTRACT

This trial was designed to evaluate the off-label use of ceftiofur in one-day-old broiler chicks, simulating a prophylactic measure of drug use together the Marek vaccine that is a prophylactic treatment that has been done in some commercial hatcheries, on the emergence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL-*E. coli*). A total of ~~132~~168 chicks (Cobb500[®]) were used in a completely randomized design. Birds were assigned to two treatments (saline solution vs ceftiofur administration) and six repetitions, with ~~11~~14 animals each. Cloacal swabs were collected from 1 to 14 days post-hatch. The majority (86%; p_{\leq} ~~0.003~~0.001) of the ESBL-producing isolates harboring *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} genes originated from animals receiving the antimicrobial. None of the isolates were positive for plasmid-mediated AmpC betalactamase genes (*bla*_{ACC}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX} and *bla*_{MIR}) used in this study. These findings indicate that the off-label use of ceftiofur with Marek's

vaccine is associated with the short-term increase in ESBL-producing *E. coli* in the gut of chicks.

Keywords: *bla*_{CTX-M} gene; *bla*_{SHV} gene; extended-spectrum beta lactamase; poultry; third-generation cephalosporin.

1. INTRODUÇÃO

O uso não terapêutico de antimicrobianos em animais de produção é uma prática comum para controle e prevenção de doenças, bem como, para melhorar o desempenho. Estudos prévios demonstraram a ligação entre o uso de antimicrobianos sem prescrição em animais e o aumento da resistência antimicrobiana (BARON et al., 2015; GIBBONS et al., 2016). As cefalosporinas de terceira geração estão entre os antimicrobianos considerados de crítica importância medicina humana (COLLIGNON et al., 2016) e seu uso indiscriminado é de grande preocupação para a saúde pública.

O ceftiofur é comumente administrado em pintainhos de um dia, juntamente com a vacina da Marek em incubatórios comerciais, como forma de prevenir doenças em frangos (WEBSTER, 2009). O uso de ceftiofur na produção avícola tem sido responsável pelo aumento de isolados resistentes de *E. coli* e *Salmonella* Heidelberg no Canadá (DUTIL et al., 2010). Ceftiofur também foi relacionado com o aumento do gene *bla*_{CTX-M} em amostras de *E. coli* oriundas de fezes de suínos e bovinos (HORTON et al., 2011). A potencial disseminação de isolados de *E. coli* resistentes ou mesmo dos seus plasmídeos que codificam resistência, seja por contato direto ou ingestão de alimentos

contaminados, representa um risco preocupante para a saúde pública. O objetivo deste estudo foi investigar experimentalmente os efeitos da administração de ceftiofur simulando o uso em conjunto com a vacina de Marek em pintainhos de um dia sobre o surgimento de *Escherichia coli* (*E. coli*) produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) no intestino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A proposta experimental foi submetida e aprovada (protocolo 6513240218), pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal da Paraíba (CEUA / UFPB), credenciado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1 Incubação dos ovos

Duzentos ovos férteis foram obtidos de um incubatório comercial (Guaraves Alimentos Ltda, Guarabira, PB, Brasil), originado de matrizes de Cobb500 com 44 semanas de idade. Eles foram colocados em 2 incubadoras artificiais (100 ovos em cada) modelo IP130 (Incubadoras Premium Ecológica Ltda, Brasil) com temperatura (37,7°C) e umidade (60%) padrão, e rotação automática a cada duas horas (Figura 1). No décimo primeiro (11º) dia de incubação foi realizada a ovoscopia com intuito de descartar os ovos claros e com embriões mortos.



Figura 1. Ovos férteis arranjados para incubação

2.2 Instalações e dieta

Após a eclosão, 168 pintainhos foram pesados individualmente (peso médio de $47,0 \pm 0,5\text{g}$) e distribuídos em dois tratamentos e seis repetições, com 14 animais por repetição. Os pintainhos foram mantidos em caixas de papelão (50 x 50 x 50 cm), forradas com papel celofane recobertos com cama de maravalha esteril (Figura 2). Cada caixa foi equipada com comedouros e bebedouros, além de coberta com nylon para evitar contaminação entre caixas por vetores como moscas. Termo-higrômetros (Oregon Scientific, EUA) foram usados para monitorar a temperatura e a umidade relativa do ar na sala.

A ração fornecida aos animais foi elaborada a base de milho e farelo de soja para a fase inicial, seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011) com os seguintes níveis: 22,20% de proteína bruta, 2.950 kcal / kg de energia metabolizável, 1,31% de lisina digestível, 0,94% de metionina + cistina digestíveis e 0,852% de treonina digestível, sem adição de antimicrobianos.



Figura 2. Disposição das caixas e seus respectivos tratamentos na sala experimental

2.3 Grupos experimentais

Os animais foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em dois grupos: um grupo controle (CG) e um grupo com administração de ceftiofur (AG) (Figura 3). Animais do GC receberam 0,2 mL de solução salina estéril, por via subcutânea; os animais do AG receberam administração de 0,2 mL de solução de ceftiofur estéril por via subcutânea, contendo 0,2 mg de ceftiofur (CEF) sódico. Tanto solução salina quanto ceftiofur foram administrados logo após serem arranjados nas caixas dos respectivos tratamentos.



Figura 3. Pintainhos alojados nas caixas experimentais

2.4 Colheita de amostras e análises microbiológicas

Foram colhidos esfregaços de *swabs* cloacais de dois animais de cada repetição, escolhidos ao acaso, nos dias 0 (antes da aplicação de ceftiofur ou salina), 3, 5, 7, 9, 11 e 14 pós eclosão. Os *swabs* foram colocados em meio caldo Luria-Bertani (Himedia, Índia) suplementado com CEF (2mg / L) e incubados a 37°C por 24 h. Em seguida, uma alíquota de 20 µL foi semeada em meio ágar MacConkey (Acumedia, EUA) suplementado com CEF (2mg / L) e incubado a 37°C por 24 h. Colônias capazes de fermentar lactose, em quantidade de quatro colônias por placa, mostrando características de *E. coli*, foram transferidas para o meio ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Himedia, Índia). Posteriormente, colônias sugestivas de *E. coli* foram confirmadas pelos seguintes testes bioquímicos: ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (Himedia, Índia), Ágar Ferro de Lisina (LIA) (Himedia, Índia), Sulfeto Indol Motilidade (SIM) (Acumedia, EUA), Ágar Citrato de Simmons (Oxoid, Reino Unido) e Ágar-base de Ureia (Oxoid, Reino Unido) (Figura 4).

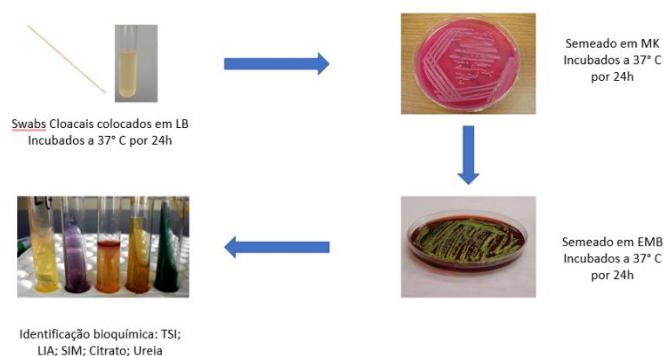


Figura 4. Esquema de isolamento e identificação dos isolados de *E. coli*

2.5 Suscetibilidade antimicrobiana

As colônias confirmadas como *E. coli* foram testadas quanto à suscetibilidade antimicrobiana pela técnica de disco-difusão, de acordo com os parâmetros do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) para os seguinte antimicrobianos: amoxicilina / clavulanato (Amc, 20/10 µg, Cecon, São Paulo, Brasil), aztreonam (ATM, 30 µg, Cecon) cefotaxima (CTX, 30 µg, Cecon), ceftazidima (CAZ, 30 µg, Cecon), ceftriaxona (CRO, 30 µg, Cecon), ciprofloxacina (CIP, 5 µg, Cecon), cloranfenicol (C, 30 µg, Cecon), gentamicina (GM, 10 µg, Cecon), sulfisoxazol / trimetoprim (SXT, 23,75 / 1,25 µg, Cecon) e tetraciclina (Te, 30 µg, Cecon).

A concentração inibitória mínima do CEF também foi determinada nas amostras identificadas como *E. coli*. Foi utilizado o método de microdiluição em caldo usando placas de 96 poços contendo concentrações de ceftiofur entre 0,5 µg / mL a 256 µg / mL. Os critérios utilizados para interpretação do resultado da CIM como suscetíveis ($CIM \leq 2$ mg / L), intermediários (4 mg / L) ou resistentes (≥ 8 mg / L) foram de acordo com estabelecido pelo CLSI (2015).

2.6 Detecção fenotípica de isolados produtores de beta-lactamases de espectro estendido ESBL

A detecção fenotípica de ESBL foi realizada pelo teste de sinergia em disco duplo, usando os discos CTX, CAZ e CRO colocados a uma distância concêntrica de 20 mm ao disco Amc, como sugerido pelo CLSI (2015). Para cada placa, todos os isolados

de *E. coli* apresentando diferentes padrões de resistência foram posteriormente confirmados, portanto, em alguns casos, mais de um isolado foi recuperado por pintainho para identificação fenotípica.

2.7 Extração de DNA

O DNA dos isolados foram extraídas pelo método de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1), seguindo protocolo previamente descrito com modificações (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). O inóculo foi crescido em caldo Infusão de Cérebro-Coração (BHI) durante 18 h a 37°C e, posteriormente, 1,4 mL do caldo com inóculo foram transferidos para um tubo tipo eppendorf, e centrifugados a 14.000 rpm / 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado em 500 µL de tampão TE (1M Tris- HCl, pH 8,0; 0,5 M EDTA, pH 8,0) acrescido de lisozima (10 mg / mL) e de proteinase K (5 mg / mL), com 10 µL de cada. Esta solução foi homogeneizada em vórtex e incubada durante a noite a 60°C.

Na sequência, 10 µL de tampão STE (1 M Tris- HCl, pH 8,0; 0,5 M EDTA, pH 8,0; 5 M NaCl) foram adicionados e incubados por 15 min a 60° C. Em seguida, 130 mL de acetato de amônio (7,5 M) foram adicionados, seguidos de incubação em gelo (15 min) e centrifugação (14.000 rpm / 15 min). Após centrifugação, 750 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) foi adicionado antes de, novamente, centrifugar a 14.000 rpm / 5 min.

O sobrenadante (aproximadamente 400 µL) foi novamente transferido a um novo tubo, e 420 µL de etanol absoluto foram adicionados e incubados durante a noite a -20° C. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação (14.000 rpm / 15 min), e o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 30 µL de água livre de DNase / RNase. A concentração e a pureza foram determinadas a 260/280 e 260/230 utilizando espectrofotômetro (Colibri, Titertek Berthold, Alemanha).

2.8 Detecção genotípica de isolados produtores de beta-lactamases de espectro estendido ESBL

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em amostras oriundas de diferentes animais (pintainhos) ou de um mesmo animal com diferentes perfis de resistência. Todas as amostras de DNA foram previamente justadas para concentração de 50 ng / μ L usando um espectrômetro de microvolume (Colibri, Titertek Berthold, Alemanha). As reações de PCR foram realizadas em termociclador (TPersonal Thermocycler, Biometra, Alemanha), no volume de 25 μ L, sendo 23 μ L de *mastermix* (1 pmol de primer, 200 mM de cada dNTP, 3 mM de $MgCl_2$ e 1U de Taq DNA polimerase) e 2 μ L de DNA genômico.

Os isolados de *E. coli* foram testados por PCR para os genes codificadores de ESBL (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{SHV}), bem como genes mediados por plasmídeos que codificam AmpC (*bla*_{ACC}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX} e *bla*_{MIR}), usando sequência de primers e condições descritas previamente (Tabela 1).

A visualização dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% (LGC Biotechnology, Brasil), corados com GelRed (Biotium, EUA). As condições de corrida foram ajustadas para 100 V por 60 minutos em tampão TBE a 1x. A presença ou ausência de amplicons foi analisada visualmente sob luz ultravioleta, com auxílio de fotodocumentador (Gel Logic 212 PRO v.5.0, Carestream Health, Rochester, EUA).

2.9 Análise de relação genética por PCR

Para avaliação da relação genética entre os isolados estudados foi utilizado a técnica PCR para Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano (ERIC-PCR) (Tabela 1). Para tal, o DNA previamente extraído foi ajustado a uma concentração de 50 ng / μ L usando um espectrômetro de microvolume (Colibri, Titertek Berthold, Alemanha). As reações foram realizadas em 25 μ L contendo 1 pmol de primer, 200 mM de cada dNTP, 3 mM de $MgCl_2$, 100 ng de DNA genômico e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), e amplificação realizada em termociclador (TPersonal Thermocycler, Biometra, Alemanha).

Os produtos foram analisados por eletroforese (corrida a 100 V por 60 minutos em tampão TBE a 1x) em gel de agarose a 2% (LGC Biotechnology, Brasil) corados com GelRed (Biotium, EUA). A presença ou ausência de amplicons foi analisada visualmente em fotodocumentador sob luz ultravioleta (Gel Logic 212 PRO v.5.0, Carestream Health, Rochester, EUA).

2.10 Análise dos dados

Os padrões de amplicons de ERIC-PCR foram examinados e analisados usando o coeficiente de correlação de dados do produto Dice (a 2% de tolerância) com utilização do software BioNumerics (Versão 7.1, Applied Maths, Bélgica). A análise de agrupamento e construção do dendrograma foram realizados pelo método do grupo de pares não ponderados com médias aritméticas (UPGMA). A cepa de *E. coli* (ATCC 25922) foi usada como controle interno (*outgroup*) na construção do dendrograma. O poder discriminatório (*D-value*) foi calculado como descrito por Hunter (1990).

A comparação da frequência geral dos do fenótipo dos isolados de *E. coli* produtores de ESBL, entre os grupos GC e AG, foi realizada pelo teste exato de Fisher, a 5% de probabilidade. Já a probabilidade de ocorrência dos genes testados (ESBL ou AmpC), ao longo do período experimental, entre os grupos controle e tratamento, foi determinada por abordagem bayesiana de regressão binomial logística com 8.000 repetições. As análises estatísticas foram realizadas no software R (2017).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar os genes de resistência antimicrobiana codificadores de ESBL, AmpC e *Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus* (ERIC).

Gene	Tamanho do Amplicon (bp)	Sequência dos primers (5'-3')	Condições de amplificação	Referencia
<i>bla_{SHV}</i>	930	F: GGGTTATTCTTATTGTCGC R: TTAGCGTTGCCAGTGCTC	Desnaturação inicial: 94°C 5 min 30 ciclos Desnaturação: 94°C 1 min Anelamento: 54°C 1 min Extensão: 72°C 1 min Extensão final: 72°C 5 min	WARJRI et al., 2015
<i>bla_{CTX-M}</i>	554	F: SCSATGTGCAGYACCAGTAA R: CCGCRAT ATGRTTGGTGGTG	Desnaturação inicial: 94°C 3 min 35 ciclos Desnaturação: 94°C 30 seg Anelamento: 55°C 30 seg Extensão: 72°C 45 seg Extensão final: 72°C 5 min	
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	854	F: AAATCACTGCGYCAGTTCA R: GGTGACGATTTTAGCCGCCG	Desnaturação inicial: 94°C 5 min 30 ciclos	DROPA et al., 2015
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	870	F: GACTCAGAGCATTGCGCCG R: TCAGAAACCGYGGGTACGA	Desnaturação: 94°C 45 seg	
<i>bla_{CTX-M-8}</i>	861	F: GATGAGACATCGCGTTAAG R: GGTGACGATTTTCGCGGCA	Anelamento: 60°C 1 min Extensão: 72°C 1 min Extensão final: 72°C 10 min	
<i>bla_{MOX}</i>	520	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCAT	Desnaturação inicial: 94°C 3 min 25 ciclos	PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002
<i>bla_{CMY-2}</i>	462	F: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA R: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
<i>bla_{DHA}</i>	405	F: AACTTTACAGGTGTGCTGGGT R: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	Desnaturação: 94°C 30 seg	
<i>bla_{ACC}</i>	346	F: AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA R: TTCGCCGAATCATCCCTAGC	Anelamento: 64°C 30 seg	
<i>bla_{MIR}</i>	302	F: TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG R: CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	Extensão: 72°C 1 min Extensão final: 72°C 7 min	
<i>bla_{FOX}</i>	190	F: AACATGGGGTATCAGGGAGATG R: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
ERIC	Variável	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Desnaturação inicial: 94°C 3 min 30 ciclos Desnaturação: 94°C 1 min Anelamento: 50°C 1 min Extensão: 72°C 2 min Extensão final: 72°C 5 min	YU, et al., 2011

3. RESULTADOS

No total, 57 isolados de *E. coli* resistentes ao ceftiofur foram obtidos e confirmados pelo método de disco-difusão. Destes, 52 (91,2%) foram recuperados do grupo AG ao longo dos dias 5 (10; 17,5%), 7 (12; 21,1%), 9 (9; 15,8%), 11 (7; 12,3%) e 14 (19; 33,3%); cinco (8,8%) isolados de *E. coli* resistentes a ceftiofur foram obtidas a partir do CG, todos no último dia de colheita (14 dias). Nenhum isolado característico de *E. coli* foi recuperado nos dias 0 e 3.

De acordo com a susceptibilidade antimicrobiana, altas taxas de resistência foram observadas para CTX (100%), Te (100%), CRO (94,7%), STX (54,4%), ATM (42,1%) e CIP (40,4%). Baixas taxas de resistência foram observadas para CAZ (17,5%), Amc (14%) e GM (8,8%) através do método de disco-difusão. Todos os resultados da resistência fenotípica estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Resistência antimicrobiana das 57 *E. coli* cultivadas a partir de pintainhos que receberam ceftiofur (AG) e pintainhos que receberam apenas solução fisiológica (CG). Os isolados foram recuperados a partir de ágar MacConkey suplementado com ceftiofur (2mg / L).

Antimicrobianos	Frequência de resistência		
	AG*	CG#	Total (%)
Amc (20 / 10 µg)	8	0	8 (14)
ATM (30 µg)	22	2	24 (42.1)
CTX (30 µg)	52	5	57 (100)
CAZ (30 µg)	10	0	10 (17.5)
CRO (30 µg)	49	5	54 (94.7)
CIP (5 µg)	22	1	23 (40.4)
C (30 µg)	19	1	20 (35.1)
GM (10 µg)	5	0	5 (8.8)
SXT (23.75 / 1.25 µg)	29	2	31 (54.4)
Te (30 µg)	52	5	57 (100)

Antimicrobianos testados: Amc = amoxicilina + ácido clavulânico; ATM = aztreonam; CTX = cefotaxima; CAZ = ceftazidima; CRO = ceftriaxona; CIP = ciprofloxacina; C = cloranfenicol; GM = gentamicina; SXT = sulfisoxazole + trimetoprim; Te = tetraciclina.

* grupo com administração de antimicrobiano

grupo controle

Na Tabela 3 estão todos os 57 isolados de *E. coli* recuperados, demonstrando resistência ao CEF (MIC \geq 8 µg / mL). 19% (11/57) apresentaram MIC \geq 8 µg / mL;

23% (13/57) $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g} / \text{mL}$; 14% (7/57) $\text{MIC} \geq 32 \mu\text{g} / \text{mL}$; 23% (13/57) $\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g} / \text{mL}$. Doze das 57 amostras (21%), foram altamente resistentes ao CEF, apresentando $\text{MIC} \geq 128 \mu\text{g} / \text{mL}$ (5 isolados) ou $\text{MIC} \geq 128 \mu\text{g} / \text{mL}$ (7 isolados).

Os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana demonstram que 63,2% (36/57) de todos os isolados de *E. coli* foram resistentes a três ou mais classes diferentes de fármacos e, portanto, foram considerados multirresistentes (MDR). Destes, 14 isolados (24,6%) apresentaram resistência a mais de cinco classes de antimicrobianos (Tabela 4).

Na Tabela 5 estão descritas as amostras genotipicamente resistentes. No total, 24 (42,1%) isolados fenotipicamente confirmados como ESBL ao longo do experimento e posteriormente investigados por PCR. Quatorze (58,3%) isolados foram confirmados pelos genes produtores de ESBL, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}. Nenhum dos genes que codificam genes AmpC foram identificados dentre os isolados.

Apenas 3/24 (12,5%) destes isolados foram obtidos do GC, enquanto 21 (87,5%) foram recuperados do AG. 12 dos 14 foram originários do AG, enquanto que somente 2 das 14 ESBL-*E. coli* recuperadas do CG carregavam esses genes. Em relação aos genes CTX-M específicos, o *bla*_{CTX-M-1} foi o tipo mais frequentemente observado (13/14); apenas um isolado abrigava *bla*_{CTX-M-8} (1/14). Nenhum *bla*_{CTX-M-2} foi detectado entre os isolados.

28	AG	R4	Dia 9	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	AG	R4	Dia 9	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	AG	R4	Dia 9	8	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
31	AG	R4	Dia 9	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	AG	R1	Dia 11	16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	AG	R1	Dia 11	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	AG	R1	Dia 11	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	AG	R1	Dia 11	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	AG	R3	Dia 11	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	AG	R6	Dia 11	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	AG	R6	Dia 11	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	CG	R1	Dia 14	16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	CG	R3	Dia 14	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	CG	R3	Dia 14	128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	CG	R3	Dia 14	64	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
43	CG	R3	Dia 14	64	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
44	AG	R1	Dia 14	64	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	AG	R1	Dia 14	64	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	AG	R1	Dia 14	128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	AG	R1	Dia 14	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	AG	R2	Dia 14	8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	AG	R2	Dia 14	128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	AG	R2	Dia 14	8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	AG	R3	Dia 14	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	AG	R3	Dia 14	32	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
53	AG	R3	Dia 14	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	AG	R4	Dia 14	64	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
55	AG	R4	Dia 14	64	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	AG	R4	Dia 14	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	AG	R4	Dia 14	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Amc = amoxicilina + ácido clavulânico; ATM = aztreonam; CTX = cefotaxima; CAZ = ceftazidima; CRO = ceftriaxona; CIP = ciprofloxacina; C = cloranfenicol; GM = gentamicina; SXT = sulfisoxazole + trimetoprim; Te = tetraciclina.

* grupos: AG = grupo controle; AG = administração de antimicrobiano.

caixa repetição do tratamento: R1 = caixa de repetição experimental 1; R2 = caixa de repetição experimental 2; R3 = caixa de repetição experimental 4; R1 = caixa de repetição experimental 4; R5 = caixa de repetição experimental 5; R6 = caixa de repetição experimental 6.

Tabela 4. Frequências dos perfis de resistência antimicrobiana entre 57 *E. coli* resistentes ao ceftiofur, cultivadas de pintainhos que receberam ceftiofur (AG) e pintainhos que receberam somente solução salina (CG).

Grupo*	Perfil de resistência	Frequência (%)
AG	CRO, CTX, Te, C, SXT, CIP	13 (22.8%)
AG	CRO, CTX, ATM, Te	08 (14.03%)
AG	CRO, CTX, Te	07 (12.3%)
AG	CRO, CTX, ATM, CAZ, Te, SXT	04 (7.01%)
AG	CTX, Te, C, SXT, CIP	03 (5.3%)
AG	CRO, CTX, Amx, Te, C, SXT, CIP	03 (5.3%)
AG	CRO, CTX, ATM, Te, SXT	02 (3.5%)
AG	CRO, CTX, ATM, CAZ, Te	02 (3.5%)
AG	CRO, CTX, GM, Te	01 (1.7%)
AG	CRO, CTX, ATN, CAZ, Amx, GM, Te	01 (1.7%)
AG	CRO, CTX, Te, CIP	01 (1.7%)
AG	CRO, CTX, GM, Te	01 (1.7%)
AG	CRO, CTX, ATM, CAZ, Amx, Te, SXT	01 (1.7%)
AG	CRO, CTX, ATM, Amx, Te, C, SXT, CIP	01 (1.7%)
AG	CRO, CTX, ATM, Te, C	01 (1.7%)
AG	CRO, CTX, ATM, CAZ, Amx, GM, Te, SXT	01 (1.7%)
AG	CRO, CTX, GM, Te, SXT, CIP	01 (1.7%)
AG	CRO, CTX, ATM, CAZ, Amx, Te	01 (1.7%)
CG	CRO, CTX, ATM, Te	02 (3.5%)
CG	CRO, CTX, Te, C, SXT, CIP	01 (1.7%)
CG	CRO, CTX, Te, SXT	01 (1.7%)
CG	CRO, CTX, Te	01 (1.7%)

Antimicrobianos testados: Amc = amoxicilina + ácido clavulânico; ATM = aztreonam; CTX = cefotaxima; CAZ = ceftazidima; CRO = ceftriaxona; CIP = ciprofloxacina; C = cloranfenicol; GM = gentamicina; SXT = sulfisoxazole + trimetoprim; Te = tetraciclina.

* grupos: AG = grupo controle; AG = administração de antimicrobiano.

O resultado da genotipagem por ERIC-PCR está apresentado na Figura 5. Os 14 isolados positivos para os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} foram agrupados em três clusters principais (A, B e C). Os isolados dos grupos CG e AG foram agrupados em diferentes clusters. Isolados do grupo AG ficaram alocados nos clusters A e B, enquanto os 2 isolados do grupo CG ficaram no cluster C. Nenhum dos isolados agruparam-se com o *outgroup* dentro dos clusters, tampouco houve diferença entre os isolados por dia de coleta. O D-valor do ERIC-PCR foi de 0,96.

Na Figura 6 pode ser visualizado a plotagem resultante da regressão binomial bayesiana. Os resultados demonstram as probabilidades da ocorrência de *E. coli* produtora de ESBL ao longo do período experimental, bem como entre os grupos

estudados. Os dias 7 e 14 foram os dias com maior probabilidade de ocorrência, enquanto que o grupo AG apresenta maior probabilidade de isolamento de ESBL-*E. coli* ($p < 0,001$).

Tabela 5. Número de animais positivos para ESBL-*E. coli* identificados fenotipicamente pelo teste de sinergia de disco duplo

Dias de Colheitas	Grupos Experimentais						Valor-p
	AG			CG			
	Pintainhos positivos/Pintainhos colhidos ^b	CIM ^c	Genes ^d	Pintainhos positivos/Pintainhos colhidos ^b	CIM ^c	Genes ^d	
Dia 5	5/12	64-256	<i>bla</i> _{CTX-M-8} ; <i>bla</i> _{SHV}	0/12	-	-	*
Dia 7	5/12	16-256	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>bla</i> _{SHV}	0/12	-	-	*
Dia 9	2/12	8	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>bla</i> _{SHV}	0/12	-	-	*
Dia 11	1/12	16	-	0/12	-	-	*
Dia 14	8/12	32-64	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>bla</i> _{SHV}	3/12	64	<i>bla</i> _{CTX-M-1} ; <i>bla</i> _{SHV}	*

a Nenhuma ESBL-*E. coli* foi recuperada entre os dias 0 e 3

b Frequência de animais abrigando *E. coli* resistente ao ceftiofur

c Faixa de concentração inibitória mínima (CIM) do ceftiofur ($\mu\text{g} / \text{mL}$)

d Genes de resistência detectados por PCR nos isolados

* Diferença significativa por análise bayesiana de regressão binomial logística ($p < 0.05$)

ESBL-producing *E. coli* Genotyping

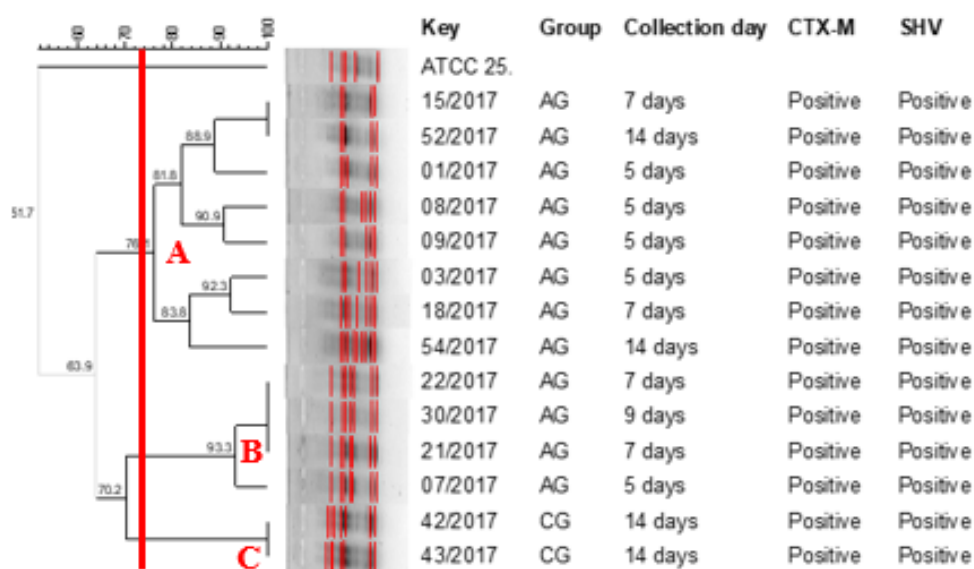


Figura 5. Dendrograma ilustrando similaridades genéticas entre ESBL-*E. coli* por ERIC-PCR. Key = Identificação do isolado; AG = grupo com administração de antimicrobiano - 0.2mL (2 mg/L) de ceftiofur; CG = grupo controle - 0.2mL de solução fisiológica.

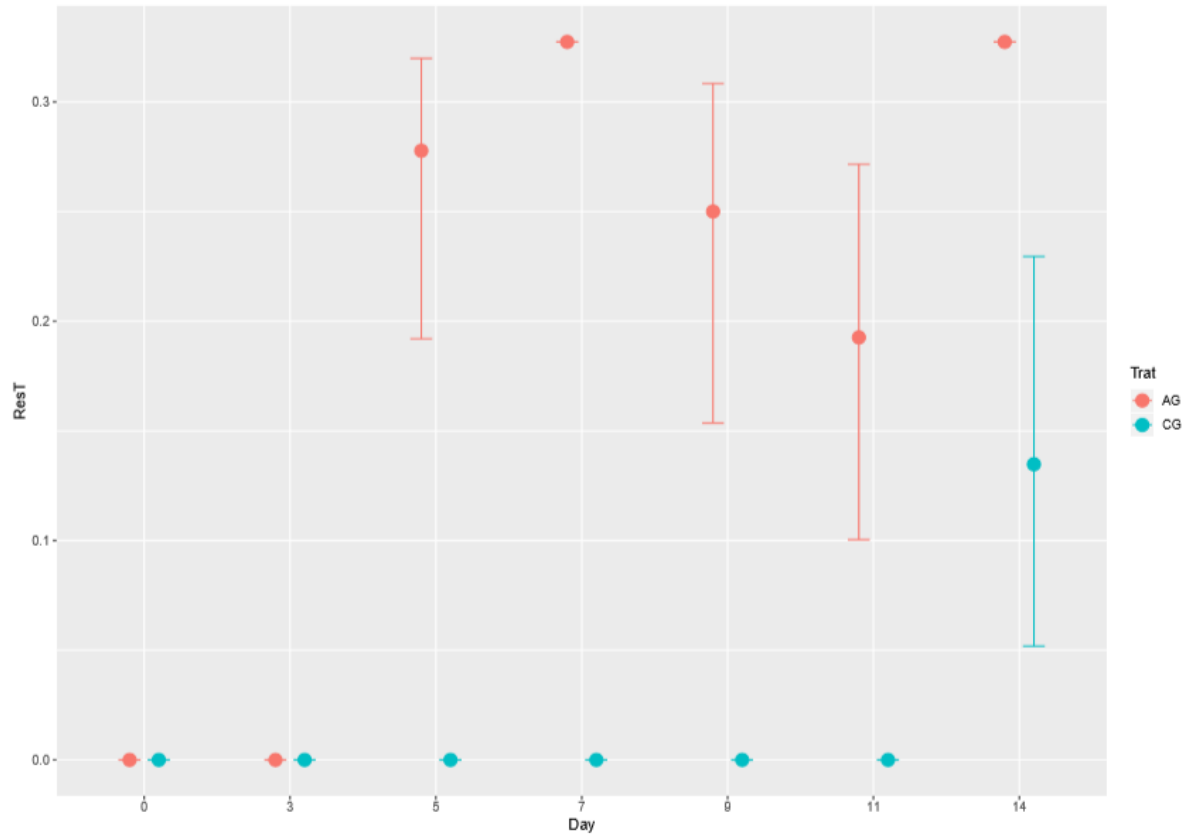


Figura 6. Gráfico da regressão binomial bayesiana da ocorrência de ESBL-*E. coli* ao longo dos dias experimentais, entre os dois grupos tratamentos: AG = grupo com administração de antimicrobiano - 0.2mL (2 mg/L) de ceftiofur; CG = grupo controle - 0.2mL de solução fisiológica.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram elevado índice de resistência entre os isolados para CTX, Te, CRO e STX, corroborando com estudos anteriores que relataram taxas de resistência antimicrobiana aumentadas em bactérias de frangos de corte e poedeiras (BARON et al., 2014) e suínos (BEYER et al., 2015) tratados com cefalosporinas de terceira geração.

Além disso, a resistência ao CTX e CEF foram identificadas em todos os 57 isolados de *E. coli*. Esta descoberta confirma um trabalho anterior que compara valores de MIC de CEF contra outras cefalosporinas, incluindo CAZ, em 118 *E. coli* de diferentes animais de produção (HIKI et al., 2017). Portanto, o uso de CTX parece ser uma abordagem bem-sucedida para avaliar a suscetibilidade do ceftiofur em enterobactérias. Isso poderia ser de especial interesse para investigações comparando resistência antimicrobiana entre isolados de fontes animais e humanas.

Em relação à resistência genotípica, 14 dos 24 isolados confirmados fenotipicamente foram positivos na PCR, todos para os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}. Similarmente aos achados de nosso estudo, *E. coli* portadores de genes *bla*_{CTX-M} mostraram-se frequentemente resistentes a CEF e CTX, mas suscetíveis à CAZ (KOJIMA et al., 2005), o que possivelmente está relacionado ao fato de que a β -lactamase CTX-M não pode hidrolisar CAZ tão eficientemente quanto CTX (QUEENAN et al., 2004).

Os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{SHV} não foram detectados em nenhuma das 33 *E. coli* resistentes ao ceftiofur e fenotipicamente negativas pelo teste de sinergia de disco duplo para detecção de ESBL. Além disso, nenhum dos 57 isolados de *E. coli* resistentes a CEF abrigou qualquer dos genes AmpC mediados por plasmídeos investigados no presente estudo, incluindo *bla*_{CMY-2}, relatado em *E. coli* resistente a CEF de origem animal de diferentes países (ZHAO et al., 2001; HEIDE et al., 2009; MARTIN et al., 2012; FANG et al., 2015; TOUZAIN et al., 2018).

Com base nestes resultados e nos resultados fenotípicos, assume-se que os 33 isolados resistentes a CEF poderiam abrigar outros genes que codificam cefamicinases que não foram investigados em nosso estudo ou talvez uma mutação no gene *ampC* cromossomal associado à hiperprodução de cefamicinases. Esta última hipótese é mais provável, uma vez que a resistência à cefoxitina em *E. coli* tem sido menos comumente associada a β -lactamases AmpC plasmidiais do que à hiperprodução de AmpC cromossomal (JACOBY, 2009).

O estudo demonstrou que a administração sem prescrição (*off-label*) de uma cefalosporina de terceira geração está associada ($p < 0,001$) à presença de *E. coli* produtora de ESBL no intestino de pintainhos. A regressão binomial logística bayesiana indicou que a probabilidade de ESBL-*E. coli* ocorrer foi significativamente maior nos pintainhos tratados, aos 7 e 14 dias, em comparação com outros dias experimentais, embora tenham sido observadas diferenças significativas entre os grupos AG e GC aos 5, 7, 9, 11 e 14 dias de idade.

Os perfis genotípicos distintos entre os isolados de ESBL-*E. coli* recuperados de AG e CG indicaram que os isolados de animais do CG emergiram de uma população diferente. Esse achado também indica que não houve contaminação cruzada de ESBL-*E. coli* de AG para animais do CG. ERIC-PCR usando o primer ERIC revelou um D-valor de 0,96, indicando que o teste foi altamente discriminatório.

Embora a disseminação clonal de ESBL-*E. coli* para humanos através da cadeia alimentar ainda não tenha sido demonstrada (BORJESSON et al., 2016), as ESBL mais comumente encontradas em bactérias isoladas em carne de frango e humanos, incluindo amostras de cultura de sangue, têm se mostrado idênticos (OVERDEVEST et al., 2011). Portanto, alimentos contaminados por *Enterobacteriaceae* resistentes aos antimicrobianos tornam-se reservatórios de genes ESBL (BORJESSON et al., 2016; CASELLA et al., 2015; KRUSE; SØRUM, 1994; OVERDEVEST et al., 2011; RANDALL et al., 2017) que podem ser adquiridos por patógenos humanos, e reduzir a eficácia dos antimicrobianos na medicina veterinária e humana. Além disso, as enterobactérias produtoras de ESBL podem ser disseminadas entre animais e trabalhadores expostos, como demonstrado recentemente em matadouros de suínos (FOUNOU et al., 2018).

5. CONCLUSÃO

Até onde se tem conhecimento, este é o primeiro relato experimental demonstrando que a prática comum de administração de ceftiofur a pintainhos de um dia aumenta, em curto prazo, a eliminação de ESBL-*E. coli*. O impacto real na disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos para a cadeia alimentar, consumidores finais e meio ambiente precisa ser melhor investigado.

Entretanto, a preocupação com o uso irresponsável de antimicrobianos, seja como promotor de crescimento, seja como efeito profilático é, sem sombra de dúvidas o principal causador do aparecimento da resistência. Faz-se necessária mudança nas formas de uso destes fármacos, bem como maior fiscalização quanto ao uso destes produtos em animais de produção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARON, S. et al. Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5428–5434, jan. 2014.

BEYER, A. et al. Effects of ceftiofur treatment on the susceptibility of commensal porcine *E.coli* – comparison between treated and untreated animals housed in the same stable. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 265, out. 2015.

BÖRJESSON, S. et al. Limited dissemination of extended-spectrum β -lactamase- and plasmid-encoded ampc-producing *Escherichia coli* from food and farm animals, Sweden. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 634–640, abr. 2016.

CASELLA, T. et al. Detection of *bla*CTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 88–91, mar. 2015.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals- Third Edition. **CLSI document VET01S**. Wayne, PA, USA: CLSI; 2015.

COLLIGNON, P. C. et al. World health organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 8, p. 1087–1093, out. 2016.

DROPA, M. et al. Complex class 1 integrons harboring *ctx-m-2*-encoding genes in clinical *Enterobacteriaceae* from a hospital in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 08, p. 890–897, ago. 2015.

DUTIL, L. et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 48–54, jan. 2010.

FANG, L.-X. et al. Dissemination of the chromosomally encoded CMY-2 cephalosporinase gene in *Escherichia coli* isolated from animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 2, p. 209–213, ago. 2015.

FOUNOU, L. L. et al. Genome sequencing of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from pigs and abattoir workers in Cameroon. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, feb. 2018.

GIBBONS, J. F. et al. Antimicrobial resistance of faecal *Escherichia coli* isolates from pig farms with different durations of in-feed antimicrobial use. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 3, p. 241–250, maio 2016.

HEIDER, L. C. et al. Genetic and phenotypic characterization of the blaCMY gene from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, humans, the environment, and retail meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 10, p. 1235–1240, set. 2009.

HIKI, M. et al. Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftiofur and third-generation cephalosporins in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 5, p. 716–720, set. 2017.

HORTON, R. A. et al. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3715–3719, jan. 2011.

HUNTER, P. R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1903–1905, jan. 1990.

JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, jan. 2009.

KOJIMA, A. et al. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3533–3537, ago. 2005.

KRUSE, H.; SØRUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4015–4021, jan. 1994.

LIU, H. et al. The Prevalence of *Escherichia coli* strains with extended spectrum beta-lactamases isolated in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, abr. 2015.

MARTIN, L. C. et al. Characterization of bla CMY-2 plasmids in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from food animals in Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1285–1287, fev. 2012.

OVERDEVEST, I. et al. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1216–1222, jul. 2011.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153–2162, jan. 2002.

QUEENAN, A. M. et al. Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 269–275, jan. 2004.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistic Computing**. Vienna Austria. 2017. URL <https://www.R-project.org/>.

RANDALL, L. P. et al. Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, n. Supplement C, p. 283–290, jan. 2017.

ROSTAGNO, H.S. et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: **Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3rd ed. Viçosa: UFV; 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, n. Ed. 2, 1989.

TOUZAIN, F. et al. Characterization of plasmids harboring blaCTX-M and blaCMY genes in *E. coli* from french broilers. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0188768, jan. 2018.

WARJRI, I. et al. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases (blaCTX-M-1 and blaSHV) producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Mizoram. **Veterinary World**, v. 8, n. 5, p. 599–604, maio 2015.

WEBSTER, P. The perils of poultry. **Canadian Medical Association Journal**, v. 181, n. 1–2, p. 21–24, jul. 2009.

YE, Y. et al. Isolation of *Salmonella* from meat samples and characterization by enterobacterial repetitive intergenic consensus–polymerase chain reaction and antibiotics test. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 8, p. 935–937, mar. 2011.

ZHAO, S. et al. Identification and expression of cephamycinase bla CMY genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3647–3650, dez. 2001.

CAPÍTULO III

**Avaliação experimental do tratamento da cama de frango na
transferência horizontal de ESBL-plasmídeos em *E. coli***

**Avaliação experimental do tratamento da cama de frango na transferência horizontal de
ESBL-plasmídeos em *E. coli***

RESUMO

O uso de antimicrobianos na produção animal tem impulsionado o surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos. Na criação de frangos de corte, cepas resistentes podem ser eliminadas na cama pelas fezes, contaminando ambiente e funcionando como fonte para disseminação de genes de resistência. O objetivo desse estudo foi descrever os efeitos in vitro de resíduos químicos em diferentes materiais usados como cama de frango sobre a taxa de conjugação de R-plasmídeos em *E. coli*. Os grupos controle, sem adição de químicos, apresentaram as maiores médias das taxas de conjugação (-3,39910 Log e -3,60025 Log, para cama de bagaço de cana e maravalha, respectivamente). A cal virgem e superfosfato apresentaram menores taxas de conjugação em cama de maravalha (-5,01063 Log) e cama de bagaço de cana (-6,30237 Log), respectivamente. Na comparação entre os dois substratos, a cama de frango composta de maravalha demonstrou maiores taxas de conjugação em relação à de bagaço de cana. A presença de produtos químicos pode afetar a eficiência da conjugação, apesar dos fatores ambientais desempenharem importante papel na transferência de R-plasmídeos.

Palavras-chave: avicultura; cal virgem; sulfato de alumínio; sulfato de cobre; superfosfato; transferência de plasmídeos

**Experimental evaluation of poultry litter treatment in the horizontal transfer of
ESBL-plasmids in *E. coli***

ABSTRACT

The use of antimicrobials in animal production has determined the emergence of antimicrobial resistant bacteria. In broilers resistant strains can be eliminated in poultry litter by feces, contaminating environment and functioning as a source for resistance gene dissemination. The aim of this study was to describe the chemical residue effects in vitro on different materials used as poultry litter on the R-plasmid conjugation rates in *E. coli*. The control groups, without addition of chemicals, presented the highest averages of conjugation rates (-3.39910 Log and -3.60025 Log, for cane bagasse and wood shavings, respectively). The quicklime and superphosphate presented lower rates of conjugation in litter of shavings (-5.01063 Log) and litter of cane bagasse (-6,30237 Log), respectively. In the comparison between the two substrates, the poultry litter composed of wood shavings showed higher conjugation rates regarding that of cane bagasse. The presence of chemicals may affect the efficiency of conjugation, although environmental factors play an important role in the R-plasmid transfer.

Keywords: aluminum sulfate; copper sulfate; plasmid transfer; poultry; quicklime; superphosphate

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de bactérias multirresistentes tem sido uma preocupação global à saúde pública. Um grande debate sobre o real impacto do uso de drogas antimicrobianas em animais de produção e o surgimento de infecções multirresistentes em humanos tem ocorrido nos últimos anos (ECONOMOU; GOUSIA, 2015; JINDAL et al., 2015; VAN BOECKEL et al., 2015). Embora haja um número crescente de relatos sobre a ocorrência de bactérias multirresistentes em animais de produção (DAHMS et al., 2015; KASPERSEN et al., 2018), existem poucos estudos enfocando a dinâmica de genes de resistência a antimicrobianos na interface animal-ambiente.

Em sistemas intensivos de produção avícola, a cama representa uma mistura da cama em si, composta de maravalha ou materiais alternativos, com excrementos de aves, ração e água que se acumulam durante o período de criação (LJUBOJEVIC et al., 2016), favorecendo a multiplicação de microrganismos. Cerca de 90% dos antimicrobianos utilizados na produção avícola não são absorvidos e, portanto, são eliminados na cama por excrementos animais (HEUER; SCHMITT; SMALLA et al., 2011; KUMAR et al., 2005; SARMAH et al., 2006). As condições ideais para o crescimento microbiano, juntamente com a presença de concentrações baixas, mas constantes, de resíduos antimicrobianos podem aumentar a seleção de bactérias resistentes e tornar a cama um potencial biorreator.

A cama também é importante componente econômico dos sistemas de produção de aves. Embora a cama de frango tenha sido utilizada como adubo natural na produção agrícola, a reciclagem da cama por meio de produtos químicos entre lotes consecutivos é uma prática comum na produção avícola moderna, a fim de reduzir os custos de produção e diminuir o impacto ambiental da atividade (TASHO; CHO, 2016). Considerando a alta complexidade epidemiológica da resistência antimicrobiana (HOLMES et al., 2016), em que não apenas bactérias, mas também genes de resistência

antimicrobiana podem ser disseminados entre animais, homens e ambiente (HUDDLESTON, 2014; LIU et al., 2016), ainda não é bem compreendido o papel dos fatores de seleção na produção animal que podem estar associados ao surgimento e à disseminação da resistência antimicrobiana.

Naturalmente presentes nas aves domésticas, *E. coli* são isolados bacterianos mais comumente recuperados em camas de frango (BLAAK et al., 2015). Apesar de comensais no trato gastrointestinal de frangos, algumas cepas são altamente resistentes, capazes de causar graves doenças aviárias e transmissíveis aos seres humanos (KHEIRI; AKHTARI, 2016; NHUNG et al., 2016). As concentrações de antimicrobianos do ambiente estão diretamente relacionadas a prevalência destas *E. coli* resistentes na cama de frangos (SUNG et al., 2017).

Entre as *E. coli* oriundas da indústria avícola, resistência a β -lactâmicos merecem maior cuidado. Isolados produtores de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), capazes de hidrolisar cefalosporinas, são comumente isolados em frangos e ambiente aviário (BLAAK et al., 2015). O mecanismo de resistência a ESBLs é bastante variado, entretanto, genes presentes em elementos móveis parecem ser a principal forma de produção e disseminação da resistência. Plasmídeos contendo os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CMY} são os mais encontrados em frangos e cama de frangos (DAME-KOREVAAR et al., 2017; MAAMAR et al., 2016; MENDONÇA et al., 2016).

A conjugação é um dos principais mecanismos de disseminação de genes de resistência codificados por plasmídeos que conferem resistência a antimicrobianos altamente importantes para medicina humana, como a terceira geração de cefalosporinas (WASYL et al., 2015), carbapenêmicos (WIBBERG et al., 2018) e polimixina (LIU et al., 2016). Neste estudo, realizamos um experimento controlado para descrever os efeitos de resíduos químicos em diferentes materiais usados como cama de frango sobre a taxa de conjugação de um plasmídeo que codifica genes de resistência a antimicrobianos (ESBL-plasmídeo) entre *Escherichia coli*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho experimental

O experimento foi distribuído em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 2x5, constituídos de dois substratos para cama de frango (bagaço de cana e maravalha) e cinco tratamentos químicos (Q1 - somente material de cama (controle); Q2 - 30g de cal viva (CaO)/kg de material de cama, Q3 - 10g de superfosfato/kg de material cama, Q4 - 0,1g de sulfato de cobre (CuSO₄)/kg de material de cama, Q5 - 0,1g de sulfato de alumínio (Al₂(SO₄)₃)/kg de material de cama; totalizando 10 tratamentos com 15 repetições. A concentração dos resíduos químicos foi calculada para 10% da concentração utilizada, considerando os protocolos utilizados em condições de campo (Figura 1).

Para cada grupo tratamento, 10 g de cama foram colocados em sacos plástico esterilizados (Whirl-Pack/Nasco, EUA) juntamente com 10 mL da cultura da cepa J62 (receptora) em água peptonada (3×10^7 UFC / mL). Após misturar delicadamente, os sacos foram mantidos à temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, o excesso de líquido foi desprezado, e 10 mL de água peptonada contendo a cepa H2332 (doadora) (10^7 UFC / mL) foram posteriormente adicionados e mantidos à temperatura ambiente por mais 1 hora. Novamente, o excesso de líquido foi drenado e os sacos foram incubados a 25°C por 24h.

2.2 Cepas bacterianas usadas no ensaio de conjugação

A cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) H2332 de origem humana, portadora do plasmídeo pH2332-166, foi utilizada como bactéria doadora para o ensaio de conjugação. Como previamente descrito (WANG et al., 2014), este R-plasmídeo carrega o gene *bla*_{TEM-1}. O plasmídeo também contém outros genes que confere resistência a

outras classes como: anfenicóis (*catA1*), aminoglicosídeos (*aadA1b*; *strAB*), macrolídeos (*mph-B*), tetraciclina (*tetR*; *tetA*), trimetoprima (*dfrA1*) e sulfonamidas (*sul1*; *sul2*). A cepa *E. coli* J62 com deleção do gene de metabolização da lactose (Lac-), resistente tanto ao ácido nalidíxico (Nal+) quanto à rifampicina (Rif+) (NIERO et al., 2018), foi usada como cepa receptora. Bactérias doadoras e receptoras foram cultivadas em caldo Luria-Bertani (LB) sob agitação orbital a 37° C por 24h e então transferidas para água peptonada. As concentrações foram ajustadas para 1×10^7 e 3×10^7 CFU / mL, respectivamente, e posteriormente, mantidas a temperatura ambiente durante 1h. O ensaio de conjugação foi inteiramente conduzido no Laboratório de Análise de Produtos de Origem Animal (LAPOA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB).



Figura 1. Desenho experimental de fatorial 2x5 com dois materiais de cama (bagaço de cana e maravalha e cinco tratamentos (controle, CaO, Superfosfato, CuSO₄ e Al₂(SO₄)₃).

2.3 Determinação das taxas de conjugação e análises estatísticas

Após a incubação, o conteúdo do saco foi homogeneizado em 90 mL de solução salina estéril e, em seguida, realizadas diluições seriadas (1:10). Três alíquotas (20 µL) de cada diluição foram colocadas em ágar MacConkey (Acumedia, EUA) suplementado com 70 µg de ácido nalidíxico (NAL) (Merck, Alemanha) mais 40 µg de ceftriaxona (CRO) (Merck, Alemanha) com intuito de recuperar bactérias transconjugantes; em paralelo, as alíquotas foram, também, colocadas em ágar MacConkey suplementado apenas com 70 µg de NAL, a fim de recuperar bactérias totais (transconjugantes + receptoras). Todas as placas de ágar MacConkey foram incubadas a 37°C por 24 horas (Figura 2).

As colônias de *E. coli* foram contadas em ambas as placas de ágar, e a taxa de conjugação foi calculada de acordo com Kruse; Sørnum (1994), com modificações: dividiu-se a contagem de transconjugantes (oriundas das placas de ágar MacConkey contendo NAL + CRO) pela contagem de receptoras (oriundas das placas de ágar MacConkey contendo apenas NAL).

Os dados de contagem e a taxa de conjugação, em fatorial, foram analisados usando o software estatístico SAS (2009). Os efeitos significativos foram avaliados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

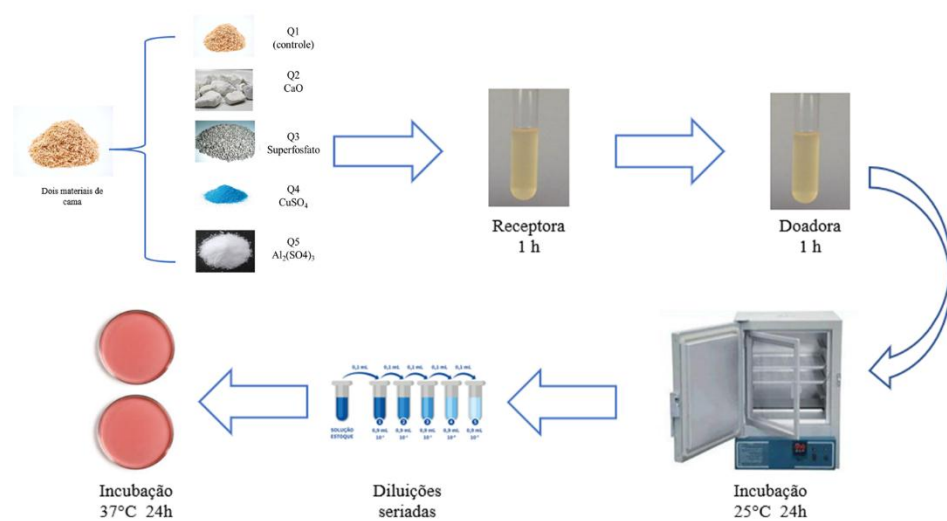


Figura 2. Esquema ilustra o passo a passo do protocolo utilizado para o ensaio de conjugação.

3. RESULTADOS

Os resultados de crescimento bacteriano total (receptora e transconjugantes) revelaram menores contagens de colônias quando o sulfato de alumínio foi adicionado às camas de frango ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa na contagem bacteriana total, entre os tratamentos Q1 a Q4 com variação de 0,09677 log, entre maior e menor média nestes tratamentos (Tabela 1).

Na Tabela 1 estão apresentados os dados de contagem das transconjugantes em camas de frango. As maiores médias de contagens foram obtidas no tratamento controle (5,55107 UFC/g), enquanto as menores médias foram obtidas com uso de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ em ambas as camas (2,81475 UFC/g).

Tabela 1. Médias (em Log) das contagens de colônias bacterianas totais e transconjugantes das cepas de *E. coli*, entre os tratamentos utilizados nos dois materiais de cama tratados com os quatro químicos.

Químicos	Contagem de colônias (médias)			
	Bactérias totais (UFC/g)	Valor-p	Transconjugantes (UFC/g)	Valor-p
Q1	9,05070 ^b		5,55107 ^d	
Q2	9,14747 ^b		3,57202 ^{bc}	
Q3	9,08359 ^b	<0,001	3,54939 ^b	<0,001
Q4	9,06651 ^b		3,71398 ^c	
Q5	8,17852 ^a		2,81475 ^a	

Médias com letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Q1 = grupo controle; Q2 = grupo com cal viva (CaO); Q3 = grupo com superfosfato; Q4 = grupo com sulfato de cobre (CuSO_4); Q5 = grupo com sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$).

Em relação as taxas de conjugação, as maiores médias foram observadas nos grupos controle (sem resíduos químicos), independentemente do material utilizado na

cama (Tabela 2). Curiosamente, nenhum crescimento bacteriano foi observado quando a maravalha foi utilizada como substrato, adicionado com sulfato de alumínio. Este resultado foi inesperado, uma vez que as taxas de conjugação mais elevadas ($p < 0,001$) ocorreram em maravalha, exceto no grupo controle, no qual não foi observada diferença estatística ($P = 0,134$).

Os tratamentos utilizados influenciaram as taxas de conjugação diferentemente, em relação aos tipos de materiais de cama de frango. As menores taxas de conjugação foram observadas quando utilizados resíduos de superfosfato e sulfato de cobre, nas camas de bagaço de cana e maravalha, respectivamente. Baixas taxas de conjugação ocorreram na presença de resíduos de cal viva em ambos os tipos de materiais de cama, em comparação com os respectivos grupos controle.

Na Tabela 2 estão apresentados os dados de transferência de R-plasmídeos na cama de bagaço de cana entre os 10 químicos estudados. Não houve interação entre os fatores quando o sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), apresentando taxas de transferências intermediárias, com média de $4,50 \times 10^{-6}$ ($-5,36394 \text{ Log}$) UFC/g.

Tabela 2. Médias (em Log) das taxas de conjugação de R-plasmídeos entre cepas de *E. coli* em dois materiais de cama tratados com os quatro químicos.

Químicos	Materiais de cama		Médias (CFU/g)	Valor-p		
	Bagaço de cana (CFU/g)	Maravalha (CFU/g)		Q	C	T*Q
Q1 [†]	-3,39910 ^{aD}	-3,60025 ^{aC}	-3,49968			
Q2	-5,94615 ^{aB}	-5,01063 ^{bA}	-5,56344			
Q3	-6,30237 ^{aA}	-4,61261 ^{bB}	-5,53430	<0,001	<0,001	<0,001
Q4	-6,07435 ^{aB}	-4,79119 ^{bAB}	-5,35257			
Q5	-5,36394 ^C	NC				
Médias (CFU/g)	-5,73703	-4,68204				

Médias com letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Q1 = grupo controle; Q2 = grupo com cal viva (CaO); Q3 = grupo com superfosfato; Q4 = grupo com sulfato de cobre (CuSO_4); Q5 = grupo com sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$).

[†] Não houve diferença significativa na taxa de conjugação de R-plasmídeos no tratamento controle, entre os diferentes substratos de ($p < 0,151$).

NC = não houve crescimento bacteriano na maravalha quando $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ foi usado.

4 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicam maior atividade bactericida de resíduos de sulfato de alumínio em maravalha que no bagaço de cana, provavelmente relacionado a um efeito de interação. Sulfato de alumínio é comumente usado para tratar a cama de frango, a fim de reduzir a amônia no ambiente de aves. Consequentemente, a cama tratada com alumínio melhora o desempenho dos frangos e reduz a mortalidade (MOORE et al., 2000), além do fato de reduzir a contaminação por *E. coli* (LINE, 2002).

Em relação a cal virgem, os resultados demonstram que ela é capaz de reduzir as taxas de contagens em ambos os substratos de cama. A cal é descrita como a primeira opção para reduzir as cargas de *Enterobacteriaceae* em cama de frango (LOPES et al., 2015), devido a sua capacidade de reduzir a umidade, bem como atividade de água (AHN; RICHARD; GLANVILLE, 2008). O CaO é eficaz para reduzir bactérias patogênicas em cerca de 2 log, mas melhores resultados são obtidos quando mais de um sanitizante é utilizado em conjunto (NGNITCHO et al., 2017).

O superfosfato é um composto resultante das rochas de fosfato com ácido sulfúrico ou ácido fosfórico, usado em todo o mundo como fertilizante agrícola. Em sistemas de produção animal, o superfosfato é usado para reduzir as concentrações de amônia (SOLIMAN; HASSAN, 2017). Os compostos de fosfato podem reduzir a presença de *E. coli* patogênica ao diminuir a deposição bacteriana e a formação de biofilme (WANG et al., 2011). No presente estudo, o superfosfato apresentou a menor taxa de conjugação em cama composta por bagaço de cana.

O sulfato de cobre é amplamente utilizado como promotor de crescimento em granjas avícolas intensivas (AMACHAWADI et al., 2015a; AMACHAWADI et al.,

2015b; LIN et al., 2017). O cobre tem sido descrito como muito eficiente contra *E. coli*, quando usado sozinho ou em conjunto com o ácido láctico (IBRAHIM et al., 2008). Embora tenhamos relatado uma diminuição na taxa de conjugação dos R-plasmídeos associados ao sulfato de cobre na cama de frango, o sulfato de cobre e outros metais pesados podem desempenhar um papel importante como um fator de co-seleção para resistência antimicrobiana (GULBERG et al., 2014). A resistência ao cobre foi encontrada em bactérias portadoras do gene *tcrB* em R-plasmídeos (AMACHAWADI et al., 2015a; AMACHAWADI et al., 2015b).

Bactérias que carregam R-plasmídeos têm sido relatadas em humanos e animais em todo o mundo (BEEN et al., 2014; CARD et al., 2017). O presente estudo indica que a conjugação de R-plasmídeos pode ocorrer na cama, mas a presença de baixas concentrações residuais de produtos químicos usados para tratar a cama reduz significativamente as taxas de conjugação. O modelo aqui utilizado para avaliar os efeitos dos resíduos químicos na taxa de conjugação de R-plasmídeos entre *E. coli* tem limitações. Em primeiro lugar, este modelo não considera comunidades microbianas complexas da cama de frango em condições de campo. Por exemplo, os resultados indicaram taxas de transferência mais altas quando comparados aos estudos *in vitro* do modelo intestinal (CARD et al., 2017), onde a disponibilidade de nutrientes e as condições do trato digestivo tornam o ambiente otimizado para interações célula a célula, favorecendo a conjugação.

Em segundo lugar, e provavelmente mais importante, o modelo usado aqui não é capaz de avaliar os efeitos dos resíduos químicos individualmente em cada um dos dois componentes que determinam a dinâmica de conjugação: a taxa de conjugação e o crescimento subsequente das transconjugantes, ou seja, seleção pós-transferência (SØRENSEN et al., 2005). Lopatkin; Sysoeva; You (2016) apresentaram nova abordagem experimental para dissociar esses dois componentes e avaliar os efeitos de concentrações sub inibitórias de antibióticos sobre a eficiência da conjugação. Portanto, este estudo assumiu a premissa de um efeito similar das substâncias químicas sobre o crescimento das populações transconjugadas e receptoras de *E. coli* usadas neste modelo foram similares.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, considerando o manejo da cama de frangos um ponto crucial da produção, tanto do ponto de vista do descarte de dejetos biológicos quanto do custo com material, a o tratamento para reutilização da cama apresenta melhor custo-benefício para avicultura. Nesse contexto o presente trabalho mostrou-se eficiente em avaliar, *in vitro*, a transferência de R-plasmídeos entre cepas de *E. coli* em cama de frango, apesar das limitações deste modelo

O uso de compostos químicos utilizados no tratamento da cama pode reduzir a eficiência de conjugação de R-plasmídeos em *E. coli*. A eficiência de conjugação variou significativamente de acordo com o material usado como cama na presença desses resíduos: em camas de bagaço de cana a adição de superfosfato apresentou melhor eficiência; em camas de maravalha a adição de CaO ou CuSO₄ apresentou melhor eficiência. Na ausência deles, estes resultados indicam que a presença dos produtos químicos pode interagir com os principais fatores intrínsecos relacionados aos compostos do material que, em última análise, afetam a eficiência da conjugação.

Por último, como as diferenças das taxas de conjugação foram mais pronunciadas entre os dois tipos de materiais do que entre os tratamentos dentro de um tipo de material, sugere-se que os fatores ambientais desempenham um papel importante na transferência horizontal de genes R-plasmídeos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, H. K.; RICHARD, T. L.; GLANVILLE, T. D. Laboratory determination of compost physical parameters for modeling of airflow characteristics. **Waste Management**, v. 28, n. 3, p. 660–670, jan. 2008.

AMACHAWADI, R. G. et al. Effects of in-feed copper and tylosin supplementations on copper and antimicrobial resistance in faecal enterococci of feedlot cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1287–1297, jun. 2015a.

AMACHAWADI, R. G. et al. Effects of in-feed copper, chlortetracycline, and tylosin on the prevalence of transferable copper resistance gene, *tcrB*, among fecal enterococci of weaned piglets. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 8, p. 670–678, jun. 2015b.

BLAAK, H. et al. Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing *E. coli* in the poultry farm environment. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135402, ago. 2015.

BEEN, M. de et al. Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. **PLOS Genetics**, v. 10, n. 12, p. e1004776, dez. 2014.

CARD, R. M. et al. An in vitro chicken gut model demonstrates transfer of a multidrug resistance plasmid from *Salmonella* to commensal *Escherichia coli*. **MBio**, v. 8, n. 4, p. e00777-17, jun. 2017.

DAHMS, C. et al. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in mecklenburg-western pomerania, Germany. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143326, nov. 2015.

DAME-KOREVAAR, A. et al. Dynamics of CMY-2 producing *E. coli* in a broiler parent flock. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 211–214, mai. 2017.

ECONOMOU, V.; GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 49–61, 1 abr. 2015.

GULLBERG, E. et al. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. **MBio**, v. 5, n. 5, p. e01918-14, 31 out. 2014.

HEUER, H.; SCHMITT, H.; SMALLA, K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 236–243, 1 jun. 2011.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, 9 jan. 2016.

HUDDLESTON, J. R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. **Infection and Drug Resistance**, v. 7, p. 167–176, 20 jun. 2014.

IBRAHIM, S. A.; YANG, H.; SEO, C. W. Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 137–143, 1 jul. 2008.

JINDAL, A. K.; PANDYA, K.; KHAN, I. D. Antimicrobial resistance: A public health challenge. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 2, p. 178–181, 1 abr. 2015.

KASPERSEN, H. et al. Occurrence of quinolone resistant *E. coli* originating from different animal species in Norway. **Veterinary Microbiology**, v. 217, p. 25–31, 1 abr. 2018.

KHEIRI, R.; AKHTARI, L. Antimicrobial resistance and integron gene cassette arrays in commensal *Escherichia coli* from human and animal sources in IRI. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 40, ago. 2016.

KRUSE, H.; SØRUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4015–4021, 1 nov. 1994.

KUMAR, K. et al. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. **Advances in Agronomy**, v. 87, p. 1–54, jan. 2005.

LIN, Y. et al. Accumulation of antibiotics and heavy metals in meat duck deep litter and their role in persistence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in different flocks on one duck farm. **Poultry Science**, v. 96, n. 4, p. 997–1006, 1 abr. 2017.

LINE, J. E. *Campylobacter* and *Salmonella* populations associated with chickens raised on acidified litter. **Poultry Science**, v. 81, n. 10, p. 1473–1477, 1 out. 2002.

LIU, Y.-Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 1 fev. 2016.

LJUBOJEVIĆ, D. et al. Epidemiological significance of poultry litter for spreading the antibiotic-resistant strains of *Escherichia coli*. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, n. 3, p. 485–494, set. 2016.

LOPATKIN, A. J.; SYSOEVA, T. A.; YOU, L. Dissecting the effects of antibiotics on horizontal gene transfer: analysis suggests a critical role of selection dynamics. **BioEssays**, v. 38, n. 12, p. 1283–1292, out. 2016.

LOPES, M. et al. An assessment of the effectiveness of four in-house treatments to reduce the bacterial levels in poultry litter. **Poultry Science**, v. 94, n. 9, p. 2094–2098, set. 2015.

MAAMAR, E. et al. High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from poultry in Tunisia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 231, p. 69–75, ago. 2016.

MENDONÇA, N. et al. Microarray evaluation of antimicrobial resistance and virulence of *Escherichia coli* isolates from portuguese poultry. **Antibiotics**, v. 5, n. 1, p. 4, jan. 2016.

MOORE, P. A.; DANIEL, T. C.; EDWARDS, D. R. Reducing phosphorus runoff and inhibiting ammonia loss from poultry manure with aluminum sulfate 1. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, n. 1, p. 37–49, jan. 2000.

NGNITCHO, P. F. K. et al. Inactivation of bacterial pathogens on lettuce, sprouts, and spinach using hurdle technology. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 43, p. 68–76, out. 2017.

NHUNG, N. T. et al. Antimicrobial usage and antimicrobial resistance in animal production in southeast asia: a review. **Antibiotics**, v. 5, n. 4, p. 37, nov. 2016.

NIERO, G. et al. High diversity of genes and plasmids encoding resistance to third-generation cephalosporins and quinolones in clinical *Escherichia coli* from commercial poultry flocks in Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 216, p. 93–98, mar. 2018.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725–759, out. 2006.

SOLIMAN, E. S.; HASSAN, R. A. Evaluation of superphosphate and meta-bisulfide efficiency in litter treatment on productive performance and immunity of broilers exposed to ammonia stress. **Advances in Animal Veteterinay Sciences**, v. 5, p. 253–259, jun. 2017

SØRENSEN, S. J. et al. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 700–710, set. 2005.

SUNG, H. W. et al. Patterns of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from fresh and recycled poultry litter. **Korean Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 3, p. 189–195, set. 2017.

TASHO, R. P.; CHO, J. Y. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. **Science of The Total Environment**, v. 563–564, p. 366–376, set. 2016.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, mai 2015.

WANG, J. et al. Nucleotide sequences of 16 transmissible plasmids identified in nine multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates expressing an ESBL phenotype isolated from food-producing animals and healthy humans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2658–2668, out. 2014.

WANG, L.; XU, S.; LI, J. Effects of phosphate on the transport of *Escherichia coli* O157:H7 in saturated quartz sand. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 22, p. 9566–9573, nov. 2011.

WASYL, D. et al. High-level fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198 epidemic clone with IncA/C conjugative plasmid carrying *bla*_{CTX-M-25} gene. **Veterinary Microbiology**, v. 175, n. 1, p. 85–91, jan. 2015.

WIBBERG, D. et al. Complete genome sequencing of *Acinetobacter baumannii* Str. K50 disclosed the large conjugative plasmid PK50a encoding the carbapenemase OXA-23 and the extended-spectrum β -lactamase GES-11. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.00212-18, fev. 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A competitividade na indústria avícola exige uma busca por elevadas produção e produtividade. A comprovada eficácia do uso de antimicrobianos na produção é uma arma amplamente utilizada em todo o mundo. Entretanto, tem sido observado com frequência criações de frangos como potencial reservatório de bactérias capazes de resistir aos antimicrobianos usados. Aliado a isso, tem sido reportado a disseminação destes isolados no ambiente, a outras espécies animais e ao homem. Como consequência há redução do efeito dos fármacos, como ceftiofur, comprometendo o tratamento de diversas doenças infecciosas.

Dessa forma, o uso de antimicrobianos não prescritos, com intuito de obter ganho produtivo, é um problema de saúde pública global que precisa ser melhor aplicado. Neste contexto, o presente estudo propôs avaliar os efeitos do uso de ceftiofur em pintainhos na ocorrência de isolados resistentes ao antimicrobiano; e avaliar o efeito do tratamento na cama de frango na transmissão horizontal de genes que conferem resistência. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o uso de ceftiofur em pintainhos de um dia está associado ao aumento de ESBL-*E. coli* a curto prazo; o tratamento da cama de frangos com produtos químicos pode afetar a transferência de genes de resistência.

Portanto, a compreensão da relação causa-efeito do uso de antimicrobianos na produção de frangos é de grande importância para determinar os reais impactos do uso indiscriminado destes fármacos em produção animal.

É importante frisar que a pretensão deste estudo não é condenar o uso de antimicrobianos na indústria avícola, mas sim discutir a importância do uso racional

deste recurso na produção de aves. A retirada por completo destes fármacos pode comprometer o bem-estar dos animais, a avaliação do custo-benefício entre o potencial econômico e o potencial risco do aumento dos níveis de resistência.

Por outro lado, continuar com o uso destas drogas de forma indiscriminada é contribuir com a proliferação de bactérias resistentes, tanto no sistema de produção, como no ambiente. Assim, o presente estudo é um ponto de partida para novas pesquisas que visem avaliar a relação causa-efeito entre uso de antimicrobianos e aumento da resistência em espécies bacterianas, mas sobretudo, na microbiota animal.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Artigo publicado no periódico científico Plos One: Off-label use of ceftiofur in one-day chicks triggers a short-term increase of ESBLproducing *E. coli* in the gut